

**LUCIANA LOPES**

**EFEITOS DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO CANOVA NO  
SISTEMA ENDOSSOMAL/LISSOSSOMAL E CORPOS LIPÍDICOS DE  
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ruth J. G. Schadeck

**CURITIBA  
2004**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ramiro e Liane, obrigada por me darem o dom da vida, por todo seu amor, apoio, carinho e ajuda. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dorly de Freitas Buchi, uma pessoa iluminada, que me orienta pelos caminhos da ciência e da vida há muito tempo. Obrigada pela dedicação, orientação, carinho e amizade, enfim por ser tão especial.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruth Janice Guse Schadeck pela atenção que dedicou a este trabalho, horas de estudo, horas na bancada e minuciosas correções.

Ao Rodrigo Antônio Pedroso, obrigada pelo seu apoio, carinho, compreensão e muito amor. Te amo.

À Aurora Pedroso, obrigada por toda ajuda com os animais, tornando possível a execução deste trabalho. Você é muito especial, obrigada por sempre me receber com tanto carinho, pelos bons conselhos e principalmente pelo meu maior presente, Rodrigo.

Ao pessoal do laboratório, por todos os bons momentos que passamos juntos, importantes experimentos e inesquecíveis congressos. Ana Paula, Beatriz, Carolina, Elenice, Felipe, Mônica, Raffaello, Simone, obrigada pela paciência, ajuda e amizade de vocês.

Aos ex-colegas de bancada, mas sempre amigos, que me ajudaram durante a realização deste trabalho, Joana, Liane, Lucas, Luis, Plínio e Sayuri.

À Lyris Godoy minha grande “pequena” amiga, que mesmo longe foi quem me ajudou a dar a volta por cima e seguir em frente no momento mais difícil, obrigada pela força e pela amizade.

À Aline, Ana Paula, Audi, Fernanda, Luciana, Mariana, Juninho, Rodrigo Serrato, meus grandes e queridos amigos, obrigada pela força, amizade e maravilhosos momentos juntos. Adoro vocês.

À minha prima Andressa L. Roveda, que muitas vezes largou seus bugius para me ajudar. Obrigada pela ajuda em muitos cultivos, companhia e auxílio ao microscópio, mas principalmente por sua amizade.

À Mariana Piemonte Moretão por ter me ajudado desde o início da iniciação científica, por ter me ensinado a coletar células, a fazer cultivo celular, por ter sanado muitas dúvidas. Obrigado pela sua boa vontade e principalmente por sua amizade.

Às secretárias Gerizalda J. Bernardo, do Departamento de Biologia Celular e Marlene B. de Camargo, do curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo apoio constante nos trabalhos administrativos.

Ao Prof. Marco Antônio Ferreira Randi, por ter me iniciado na ciência e por estar sempre disposto a esclarecer alguma dúvida. Por me ensinar muito sobre microscopia e por sempre salvar este e outros trabalhos de inúmeros problemas no computador.

À querida Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Helena Mendonça por ajudar a esclarecer muitas dúvidas, enriquecendo este trabalho.

Maurílio José Soares, obrigada pelas dicas e protocolos para os estudos envolvendo lipídios.

Ao Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho por ter disponibilizado seus equipamentos e reagentes, sempre que necessário.

À Prof<sup>a</sup>. Edith Fanta por permitir a utilização de seu microscópio.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica desta universidade, pelo uso de seus equipamentos, em especial à Ruth Janice Guse Shadeck, Matilde M. de Oliveira, Vera Regina F. Pieonteke por toda ajuda prestada.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), Aurora Pedroso, Julio Salomão, Beatriz Cesar e Edson Alves de Oliveira, pela doação dos animais utilizados neste trabalho.

Ao pessoal do biotério Cândido J. T. Pereira, Iselen de A. Ivanosque, Júlio C. Lucindo e demais funcionários por toda ajuda no trato com os animais.

Ao Canova do Brasil Ltda. Pela oportunidade de estudar a medicação e pelo apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida durante parte deste curso de mestrado.

Ao Paraná Tecnologia pelo suporte financeiro.

Aos camundongos, por cederem suas vidas à ciência.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 HOMEOPATIA .....	10
1.2 MEDICAMENTO CANOVA .....	11
1.3 SISTEMA IMUNE .....	13
1.4 MACRÓFAGOS .....	14
1.5 SISTEMA ENDOSSOMAL E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO .....	16
1.6 FOSFATASE ÁCIDA.....	19
1.7 MAGNÉSIO .....	21
1.8 CORPOS LIPÍDICOS .....	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 ANIMAIS .....	27
4.2 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	27
4.3 CULTIVO CELULAR.....	27
4.4 GRUPOS DE TRATAMENTO .....	28
4.4.1 TRATAMENTO <i>IN VIVO</i>	28
4.4.2 TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	28
4.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
4.6 interação levedura -macrófagos.....	29
4.7 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL COM TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DA ENZIMA $Mg^{++}$ ATPase.....	29
4.8 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DA ENZIMA AcPase .....	30
4.9 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL PARA DETECÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS .....	31

<b>4.10</b>	<b>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>4.11</b>	<b>CITOQUÍMICA PARA ENZIMA AcPase TOTAL E TRAP.....</b>	<b>32</b>
<b>4.12</b>	<b>MICROSCOPIA CONFOCAL DE CORPOS LIPÍDICOS .....</b>	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>FOSFATASE ÁCIDA.....</b>	<b>33</b>
5.1.1	CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL	33
5.1.2	CITOQUÍMICA EM MICROSCOPIA DE LUZ	37
<b>5.2</b>	<b>Mg<sup>++</sup>ATPase - CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3</b>	<b>CORPOS LIPÍDICOS .....</b>	<b>52</b>
5.3.1	CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL	52
5.3.2	MICROSCOPIA CONFOCAL	60
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>

## LISTA DE SIGLAS

AcPase – fosfatase acida

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ATP – adenosina trifosfato

CeCl<sub>2</sub> – cloreto de cério

CLIP – class II invariant chain-derived peptide

CME – Centro de Microscopia Eletrônica

COX – cicloxigenase

DH – diluição hahnemaniana

DMEM – *Dulbecco's modified eagle's medium*

EE – early endosome

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

HSC – heat shock protein

HSP – heat shock cognate

IFN  $\gamma$  - interferon gama

IL – interleucina

LE – late endosome

LOX – lipoxigenase

MAP – *mitogen-activated protein*

Mg – magnésio

Mg<sup>++</sup> ATPase – magnésio adenosina trifosfatase

MHC II – major histocompatibility complex class II

NO – óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion superóxido

$\text{OH}^\cdot$  - radical hidroxil

$\text{OONO}^\cdot$  - peroxinitrito

PBS – *phosphate buffer salt solution*

RNS – intermediários reativos do nitrogênio

ROS – intermediários reativos do oxigênio

SFB – soro fetal bovino

$\text{TNF-}\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

TRAP – fosfatase ácida resistente ao tartarato

## RESUMO

Canova é um medicamento homeopático que vem sendo utilizado com sucesso no tratamento de doenças onde o sistema imune encontra-se deprimido, sem ter sido detectado toxicidade e efeitos colaterais. Estudos recentes demonstraram que este medicamento atua em macrófagos, aumentando sua capacidade fagocítica e de espreadimento, mudando sua morfologia, distribuição de receptores e secreção de citocinas, sugerindo a ativação destas células. Este trabalho avalia os efeitos do medicamento Canova no metabolismo de macrófagos peritoneais de camundongo, a distribuição de seus corpos lipídicos e sua atuação no sistema endossoma/lisossoma. Em todos os experimentos, macrófagos residentes foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos suíços albinos e cultivados por 48 horas. O tratamento com Canova foi feito *in vivo* ou *in vitro*. Após a cultura as células foram processadas segundo protocolo e objetivo. Análises citoquímicas foram realizadas para a detecção das enzimas fosfatase ácida, TRAP,  $Mg^{++}$ ATPase e corpos lipídicos. A fosfatase ácida e a TRAP foram observadas em microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de luz, enquanto que a  $Mg^{++}$ ATPase somente em microscopia eletrônica de transmissão. Os corpos lipídicos foram observados pela técnica citoquímica ultraestrutural ósmio-imidazol e pela coloração com Vermelho Nilo em microscopia confocal. Os experimentos para detecção de corpos lipídicos, fosfatase ácida e TRAP foram também realizados na presença de *Saccharomyces cerevisiae*. Nestes experimentos, após 48 de cultura, as leveduras foram adicionadas ao meio na proporção 10:1 durante 2 horas, para posterior processamento e observação. Como resultado, as enzimas fosfatase ácida e  $Mg^{++}$ ATPase apresentaram um aumento de sua atividade nos macrófagos tratados com Canova, quando comparados com os controles. Grande parte das vesículas marcadas para fosfatase ácida foram também marcadas pela reação citoquímica para  $Mg^{++}$ ATPase, apresentando as mesmas características morfológicas e localização. A marcação para fosfatase ácida ocorre em praticamente todo o sistema endossomal/lisossomal. Os resultados mostram que parte dos endossomas marcados para fosfatase ácida também apresentam marcação para  $Mg^{++}$ ATPase, o que sugere diferenças funcionais entre esses compartimentos e um aumento da atividade do sistema endossomal/lisossomal de maneira geral. Em contrapartida, foi observada uma diminuição na atividade da enzima TRAP e na quantidade de corpos lipídicos de macrófagos tratados com Canova, interagindo ou não com leveduras. A diminuição de lipídios deve estar relacionada com a necessidade de maior produção de membranas por essas células que se encontram muito ativadas. Podem-se observar corpos lipídicos geralmente com muito retículo e mitocôndrias ao seu redor, sendo encontrados principalmente na periferia celular e no interior de vesículas citoplasmáticas. Quando macrófagos interagiram com as leveduras foram observados corpos lipídicos também no interior de fagossomas. A maior atividade do sistema endossomal/ lisossomal de macrófagos tratados com Canova demonstra que este tratamento pode ser um grande potencializador da capacidade fagocítica destas células.

Palavras-chave: Canova, fosfatase ácida, TRAP,  $Mg^{++}$ ATPase, corpos lipídicos.



## ABSTRACT

Canova is a Brazilian homeopathic medication that has been successfully used as an immune modulator in diseases where the immune system is depressed. It was detected neither side effects nor toxicity. Recent experiments showed that it acts on macrophages enhancing their phagocytic ability and spread capacity, changing morphology, receptors distribution and cytokines secretion, suggesting an activation process of these cells. This study evaluates the effects of Canova on metabolism of mouse peritoneal macrophages, the distribution of their lipid bodies and their endocytic pathway. For all assays, resident macrophages were collected from Swiss mouse peritoneal cavities and cultured in Eagle's medium. The cells were treated with Canova *in vivo* or *in vitro*. Cells were processed according to their appropriate protocol and objective. Cytochemical assays were performed for acid phosphatase, TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase),  $Mg^{++}$ ATPase and lipid bodies detection. Acid phosphatase and TRAP were observed in light and transmission electron microscopy,  $Mg^{++}$ ATPase only in transmission electron microscopy. Lipid bodies were observed by imidazole-buffered osmium tetroxide ultrastructural cytochemistry technique and by Nile Red stain in confocal microscopy. Lipid body, acid phosphatase and TRAP experiments were verified also in the presence of *Saccharomyces cerevisiae*. In these experiments after 48 hours of growth, macrophages were allowed to interact with microorganisms at a ratio of 10:1 during 2 hours, then processed and examined. As results, acid phosphatase and  $Mg^{++}$ ATPase enzymes showed more intense electrodense reaction product in macrophages treated with Canova when compared with controls. Acid phosphatase stain was observed in almost all endosomal/lysosomal system.  $Mg^{++}$ ATPase reaction product was found in vesicles having the same morphology and localization of those stained for acid phosphatase. This result suggests that Canova acts enhancing endosomal/lysosomal system activities. In contrast of this augment, TRAP and lipid bodies decreased in Canova treated groups. This decrease happens either when we have macrophages-yeasts interaction. Lipid bodies were founded frequently inside or around cytoplasmic vacuoles, near mitochondria and reticulum enriched regions, in both treated and controls groups. Confocal microscopy shows a decrease in the number of this organelles in *in vitro* treated macrophages. In the presence of yeasts, lipid bodies appear also in fagosomes. Canova treated cells higher endosomal/lysosomal activity shows that this treatment can be a great enhancer of the phagocytic ability.

Keywords: Canova, acid phosphatase, TRAP,  $Mg^{++}$ ATPase, lipid bodies

## 1. INTRODUÇÃO

Canova é um medicamento elaborado segundo princípios homeopáticos, que tem demonstrado sua eficácia clínica no tratamento principalmente do câncer e da AIDS. Estas doenças possuem uma terapêutica convencional agressiva ao organismo do paciente devido à toxicidade das substâncias utilizadas. Como consequência do tratamento com Canova pode-se observar redução de massa tumoral em pacientes com câncer e redução de carga viral em pacientes portadores do vírus HIV. Quando utilizado como adjuvante às terapias convencionais, observa-se uma diminuição dos efeitos colaterais da medicação alopática, proporcionando uma melhora na qualidade de vida dos pacientes.

### 1.1 HOMEOPATIA

A homeopatia, ciência baseada na lei da semelhança, é um sistema terapêutico desenvolvido pelo médico alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843) (BAROLLO, 1995).

Hahnemann abandonou a prática da medicina várias vezes antes da descoberta da homeopatia, principalmente porque não considerava ético o uso de doses múltiplas e muitas vezes tóxicas dos medicamentos convencionais (JONAS, JACOBS, 1996). No ano de 1796, Samuel Hahnemann escreveu pela primeira vez para o público sobre a *lei de similia*, o que seria a base do método homeopático. Ele sugeriu, basicamente que uma droga atua de forma terapêutica quando produz em um indivíduo saudável, sintomas semelhantes aos de um enfermo e que pessoas diferentes teriam diferentes graus de sensibilidades aos mesmos medicamentos. Seu livro clássico, "*Organon de Medicina: A arte racional da cura*", foi publicado inicialmente em 1810 com última edição escrita em 1843, pouco antes de sua morte (CLOVER, 1993).

Os tratamentos convencionais alopáticos são rápidos, mas também afetam as partes saudáveis do corpo, muitas vezes produzindo efeitos colaterais indesejados. O medicamento homeopático atua estimulando o sistema imunológico a desencadear respostas adequadas a cada situação. Como utiliza substâncias

altamente diluídas, produzem pouco ou nenhum efeito colateral. Os medicamentos homeopáticos são elaborados a partir de substâncias derivadas do reino vegetal, animal e mineral. Todas em quantidades ínfimas, através de um processo de preparação especial denominado dinamização. Esta consiste na diluição seriada das substâncias em questão, intercalada a processos rítmicos de agitação (sucussão). Cada etapa do processo homeopático de diluição é realizada de maneira decimal, desta forma 10 DH representariam uma diluição  $1 \times 10^{-10}$ . Embora sua intenção original tenha sido reduzir os efeitos tóxicos dos medicamentos, Hahnemann afirmou que a dinamização tornava os remédios mais ativos e específicos aos indivíduos sensíveis a eles (KAPLAN, 1994; PATERSON, 2002).

Portanto, a homeopatia é um método de tratamento com pouco ou nenhum efeito colateral, que utiliza substâncias especialmente preparadas e altamente diluídas, para colocar em ação os mecanismos de cura do próprio corpo e guiá-los para eliminar a doença. Parte do princípio que todos os processos psicológicos, fisiológicos e celulares são interligados e estão envolvidos na doença. Enfim, na homeopatia, não é o medicamento em si que cura a doença, mas a reação dos mecanismos de cura do organismo desencadeada pelo medicamento, que leva a cura (JONAS, JACOBS, 1996).

## 1.2 MEDICAMENTO CANOVA

O medicamento Canova, desenvolvido na Argentina por Francisco Canova, é atualmente fabricado no Brasil. Este medicamento é resultado da combinação de tinturas conhecidas na farmacopéia homeopática, derivados do *Aconitum* (11DH), *Arsenicum* (19DH), *Bryonia* (18DH), *Lachesis* (18DH) e *Thuya* (19DH) e onde DH refere-se à decimal hanemanniana (PIEMONTE, BUCHI, 2002).



*Aconitum nappelus*



*Arsenicum album*



*Bryonia alba*



*Lachesis muta*



*Thuya occidentalis*

Buchi deu início aos estudos laboratoriais com Canova em 1997, desde então vários experimentos foram desenvolvidos a respeito deste medicamento. Esses ensaios demonstraram que o medicamento Canova atua sobre macrófagos peritoneais de camundongos, promovendo sua ativação, diminuindo a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e alterando a distribuição molecular dos filamentos de actina, integrinas  $\alpha_5$  e  $\beta_1$  e receptores  $F_C$  (PIEMONTE, BUCHI, 2002).

Em 2001 foi realizado o primeiro estudo clínico randomizado duplo-cego para avaliar a eficácia do medicamento Canova em pacientes portadores de HIV. Nesse estudo foi constatada diminuição da carga viral, queda nas infecções oportunistas e diminuição dos danos hepáticos causados pela medicação convencional (SASAKI, 2001).

Monografias de conclusão de curso e dissertações de mestrado concluídas em 2002 mostraram interessantes resultados com o medicamento Canova, sugerindo alguns dos mecanismos através dos quais o medicamento possa agir e ressaltar seu potencial terapêutico.

Em macrófagos peritoneais de camundongos o tratamento com Canova aumenta a expressão e atividade das enzimas NADH oxidase *in vitro* e *in vivo*, fosfatase ácida *in vitro* e  $Mg^{++}$ ATPase *in vitro* (LOPES, 2002; OLIVEIRA, 2002). Aumenta a produção de óxido nítrico em presença ou não dos parasitas *Trypanosoma cruzi* epimastigota, *Trypanosoma cruzi* tripomastigota e *Leishmania amazonensis*. Aumenta a capacidade de espreadimento em plástico e matrigel e aumenta o índice endocítico de formas não infectivas dos microorganismos *Saccharomices cerevisiae* e *T. cruzi* epimastigota (GODOY, 2002). Em camundongos portadores de sarcoma 180 o medicamento aumentou o número de leucócitos em geral, aumentando o número de monócitos e linfócitos, entre eles os subtipos B, CD4 (T helper), CD8 (T citotóxico) e NK (Natural Killer). Aumentou o número de células NK em animais normais e portadores de sarcoma (SATO, 2002). Retardou a pega e diminuiu o volume do tumor, com 30% de regressão do mesmo, além de aumentar o infiltrado inflamatório peritumoral e permitir a fibrose peritumoral (WAL, 2002).

### 1.3 SISTEMA IMUNE

O organismo humano está continuamente exposto a microorganismos que são inalados, ingeridos ou entram em contato com a pele e mucosas. O sistema imune é uma rede integrada de células, órgãos linfóides, fatores humorais e citocinas, responsável pela defesa do organismo. Quando o sistema imune não se encontra em seu padrão normal, a defesa do organismo encontra-se comprometida: quando em baixa atividade, resulta em infecções e tumores de imunodeficiência; quando em excesso de atividade, é responsável pelo aparecimento de alergias e doenças autoimunes (SEADI, 1998; PARKIN, 2001).

O sistema imune é dividido em dois, inato e adaptativo, de acordo com sua velocidade, memória e especificidade de reação contra patógenos. O sistema imune inato consiste em mecanismos de defesa que o organismo dispõe antes mesmo de se expor à qualquer substância estranha, promove a defesa imediata do hospedeiro. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do nosso organismo, caracterizada em grande parte pela liberação de mediadores de macrófagos, neutrófilos, basófilos e mastócitos. Enquanto a resposta inata algumas vezes danifica tecidos normais por falta de especificidade, a resposta adaptativa é precisa, mas leva alguns dias ou semanas para atuar. A imunidade adaptativa tem suas respostas induzidas ou estimuladas pela exposição à substâncias estranhas, consiste em reações antígeno-específicas através de linfócitos T e B. Esse tipo de resposta possui memória, portanto exposições subsequentes levam a uma resposta mais rápida e intensa, mas não imediata (BALLOW, NELSON, 1997; PARKIN, 2001).

Os linfócitos são células que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos. No entanto, as fases de reconhecimento e ativação das respostas imunes específicas, dependem de células do sistema inato não linfóides, os fagócitos mononucleares, células dendríticas e outras populações celulares. Estas células atuam de maneira não específica para antígenos diferentes. O sistema mononuclear fagocítico é constituído de células que se originam na medula óssea, são transportadas pela circulação sanguínea e se localizam em diversos tecidos. Após a maturação e subsequente ativação, estas células assumem morfologia variada, mas com uma função em comum, a defesa do organismo através da fagocitose. O sistema mononuclear fagocítico é constituído de monoblastos,

promonócitos e monócitos na medula óssea, monócitos no sangue periférico e macrófagos nos tecidos (LASSER, 1983; ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2000).

#### 1.4 MACRÓFAGOS

Uma das células do Sistema Mononuclear Fagocítico que penetra no sangue periférico depois de deixar a medula óssea, ainda indiferenciado é o monócito. Este se fixa nos tecidos, amadurece e diferencia-se em macrófago (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2000). O macrófago foi descrito por Metchnikoff, no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocítica. Somente a partir de estudos de Mackaness, nos anos 60, a atividade secretora dessa célula adquiriu importância (NORTH, 1978). São células relativamente grandes, que medem entre 25-50µm de diâmetro, com núcleo irregular, possuem um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto bem desenvolvido, inúmeras projeções citoplasmáticas, grande número de lisossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias (AUGER, ROSS, 1992). Os macrófagos possuem um papel fundamental no sistema imune. Estão localizados em diversos tecidos e envolvidos em processos diferentes tais como reconstrução de tecidos durante a embriogênese, reparo de lesões, remoção de células senescentes ou lesadas, hemopoiese e homeostase (KLIMP et al., 2001).

Macrófagos constituem a primeira linha de defesa do organismo. Iniciam a resposta inata à infecção e mobilizam linfócitos para elaborarem respostas antígeno-específicas e humorais para proteção do organismo contra patógenos intra e extracelulares. O reconhecimento primário dos antígenos ocorre nos receptores da membrana plasmática destas células. Estes são moléculas glicoprotéicas, expressas na superfície celular, que permitem a comunicação dos macrófagos com o meio em que está localizado, recebendo informações para exercer suas funções ou para cessá-las (SILVA, QUELUZ, 1996). Estes receptores controlam as atividades dos macrófagos tais como: crescimento, diferenciação, ativação, migração, endocitose e secreção. Portanto, são importantes em processos fisiológicos e patológicos, incluindo a defesa do hospedeiro, inflamações e reparos (GORDON et al., 1988).

Macrófagos residentes são denominados aqueles que não sofreram nenhum estímulo extracelular. São células menores, quando comparadas à células ativadas,

com poucas projeções citoplasmáticas, localizados em diversos tecidos saudáveis, incluindo os macrófagos do tecido conjuntivo (histiócitos), do fígado (células de Kupffer), do pulmão (macrófagos alveolares), dos linfonodos, baço, medula óssea, dos fluidos serosos (macrófagos pleurais e peritoneais), da pele (histiócitos e células de Langerhans), entre outros (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Macrófagos ativados caracterizam-se por apresentarem diversas alterações funcionais, bioquímicas e morfológicas. O termo "macrófago ativado" foi introduzido por Mackaness, descrevendo mudanças que levavam o macrófago a aumentar sua resistência a patógenos, inflamações e neoplasias. As características dos macrófagos ativados foram muito bem definidas já em 1978, por North, Karnovsky, Lazdins e Cohn. Estas células têm sua atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica rapidamente aumentadas. Os macrófagos ativados são maiores que os não ativados, possuem maior habilidade para se aderir e espalhar, maior capacidade de endocitose e fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos, aumento da expressão e secreção de enzimas lisossomais e fatores de crescimento, aumento do consumo de oxigênio e produção de grandes quantidades de intermediários reativos do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS). Estas características lhes conferem eficiência na destruição de patógenos e células tumorais (COHN, 1978; KARNOVSKY, LAZDINS, 1978; NORTH, 1978; LASSER, 1983; ERWIG et al., 1998; KLIMP, 2001).

Os macrófagos podem exercer a função de defesa de maneira indireta, em atividades anti-tumorais e microbidas, através da secreção de citocinas ou apresentação de antígenos, regulando o sistema imune (KLIMP et al., 2001). Uma grande variedade de citocinas é secretada pelos macrófagos. As interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral (TNF) mobilizam respostas imunes inatas e sinalizam linfócitos T, via IL-10, IL-12 e IL-18, a iniciar respostas específicas contra patógenos intra e extracelulares. Os linfócitos T por sua vez, liberam a principal molécula estimuladora de macrófagos, o IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) (MURTAUGH e FOSS, 2002). Os macrófagos podem ainda exercer a função de defesa de maneira direta, envolvendo liberação de vários mediadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , IL-1, eicosanóides, ROS e RNS. Os produtos de oxigênio e nitrogênio produzidos pelos macrófagos, de ação citotóxica, incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito

(OONO<sup>-</sup>) (NATHAN, 1987; VANE et al., 1994; KLIMP et al., 2001; FORMAN, TORRES, 2001). Para a proteção dos macrófagos contra esses produtos tóxicos, os mesmos são estocados em vesículas, que podem ser colocados em contato com os fagossomos, que contém o material ingerido (PLAYFAIR, 1995).

Portanto, após o reconhecimento, os macrófagos internalizam, processam, digerem e apresentam o antígeno aos linfócitos, que vão produzir moléculas que vão desencadear respostas em outras células, inclusive nos macrófagos, ativando-os, ou seja, potencializando sua ação (STITES, TERR, PARSLOW, 2000). O processo de apresentação de antígeno envolve a ligação de peptídios antigênicos à moléculas MHC II (Major Histocompatibility Complex Class II). Após a internalização dos antígenos por endocitose, complexos peptídios/MHC II serão formados em diversas vesículas do sistema endossomal/lisossomal, principalmente nos compartimentos tardios. Os fagossomas por si só possuem pequena atividade microbicida, esta atividade chega ao fagossoma através de um processo de maturação que envolve uma série de complexos eventos de fusão de endossomas e lisossomas para a formação de fagolisossomas. A maturação do fagossoma resulta numa forte acidificação intravesicular, atividade proteolítica lisossomal e geração de ROS (GERMAIN, 1993; UNDERHILL, OZINSKY, 2002).

## 1.5 SISTEMA ENDOSSOMAL E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO

Macrófagos internalizam antígenos através da fagocitose, cavéolas, pinocitose, endocitose mediada por receptor, entre outras formas. As formas de entrada convergem para os endossomas. O sistema endocítico compreende um sistema pleiomórfico interligado que envolve vesículas, vacúolos maiores e túbulos que se comunicam entre si, com a membrana plasmática, complexo de golgi e retículo endoplasmático (GEUZE, 1999).

Os endossomas precoces (EE - *early endosome*) são as primeiras estruturas a receberem o material endocitado, possuem pH em torno de 6,2-6,5, relativamente pouca atividade proteolítica, permitem que receptores livres sejam reciclados e retornem à membrana plasmática (LUDWIG et al., 1991). Na periferia celular a rede tubular EE está conectada a pequenos vacúolos EEs, os quais selecionam proteínas



solúveis e de membrana a serem transportadas para a via endocítica, membrana plasmática e rede trans-Golgi (GEUZE, 1999). Enzimas lisossomais recém sintetizadas são introduzidas nestes compartimentos que também contém rab 5, transferrina e seus receptores (ZERIAL, STENMARK, 1993; SIMONS, ZERIAL, 1993; HOPKINS, 1983). As proteínas de membrana plasmática que são recicladas, como o receptor de transferrina, frequentemente utilizado como marcador para EE, saem dos EEs via pequenas vesículas vindas dos túbulos EEs (GEUZE, 1999).

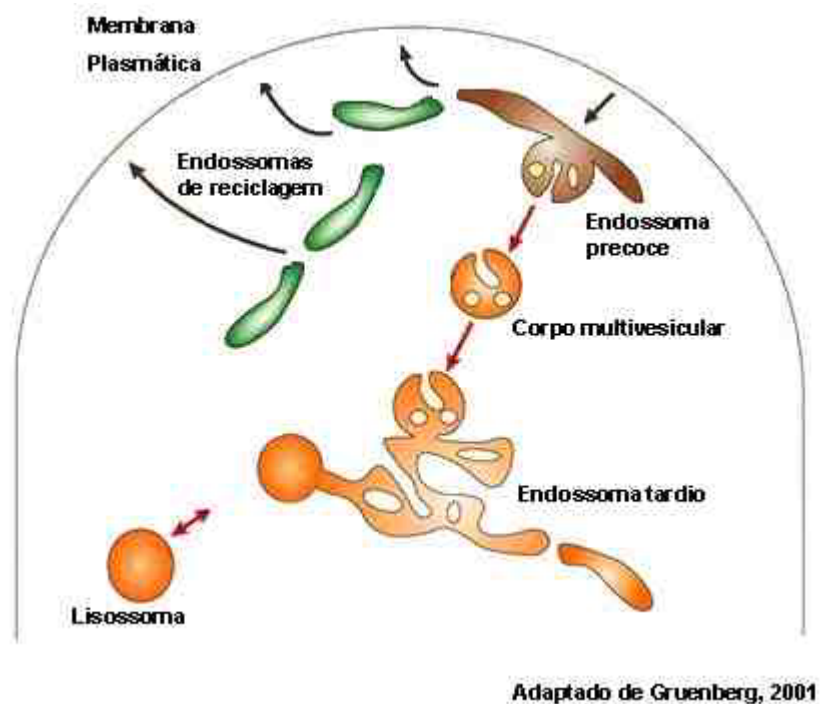


Figura 1 – Desenho representativo do sistema endossomal

Proteínas internalizadas que não são recicladas nos EEs são transportadas para os endossomas tardios (LE - *late endosome*) e lisossomas. Os LEs e corpos multivesiculares se desenvolvem a partir de vacúolos do EE. Os LEs amadurecem gradualmente, remodelando a composição de sua membrana, enquanto vesículas se fundem ou saem, transformando-se em lisossomas. Os LEs podem também fundir-se com lisossomas e vacúolos autofágicos pré-existent. O início da formação dos LEs ocorre na periferia celular e continua migrando ao longo dos microtúbulos para a região perinuclear (GEUZE, 1999). Diferentemente dos EEs e lisossomas, os LEs contém muitos receptores de manose 6-fosfato. Possuem também mais hidrolases ácidas e pH mais baixo que o dos EEs, contém rab 7 e

LAMPS (*lisosomal-associate membrane protein*) e, assim como os lisossomas, são compartimentos de degradação (GEUZE, 1999; TJELLE, 1996). Os LEs também contribuem para a reciclagem de proteínas, já que nestes compartimentos são encontradas pequenas quantidades de receptores de transferrina (KILLISCH et al., 1992). Os LEs acumulam membranas internas e muito material denso, o que resulta na característica de alta densidade dos lisossomas. Estes são os últimos compartimentos da via endocítica, com pH muito baixo, entre 4 e 5 (POOLE, OHKUMA, 1981). Possuem a maior concentração de hidrolases ácidas da via endocítica e portanto são o principal compartimento de degradação na célula (KORNFELD, MELLMAN, 1989).

Uma importante função da proteólise endossomal/lisossomal é o processamento dos antígenos que se ligam ao MHC II. Nas células apresentadoras de antígeno a maior parte das moléculas MHC II é encontrada em compartimentos LEs e lisossomas. Estas estruturas são coletivamente denominadas MIICs (*MHC class II compartments*) (GEUZE, 1998).

Moléculas MHC II são heterodímeros  $\alpha\beta$ , sintetizadas no retículo endoplasmático, cuja estrutura forma sítios que permitem a ligação de uma grande variedade de peptídeos. Os dímeros  $\alpha\beta$  recém sintetizados se associam, ainda no retículo endoplasmático, com a cadeia invariante (Ii), uma proteína que possui função chaperona para moléculas MHC II, direcionando-as para a via endocítica (VILLADANGOS et al., 2000). A maior parte dos complexos MHC II-Ii derivados da rede trans-Golgi entram na via endocítica num tipo de MIIC precoce, situado logo em seguida aos EEs e que contém muita Ii (GEUZE, 1998). Na formação do complexo  $\alpha\beta$ -Ii a CLIP (Class II Invariant Chain-Derived Peptide), uma região especializada de Ii, é inserida no sítio de ligação para peptídeos do dímero  $\alpha\beta$  de maneira similar aos peptídeos antigênicos. Esta interação é necessária para estabilizar o dímero  $\alpha\beta$  e prevenir a ligação de peptídeos residentes. Entrando na via endocítica, o complexo MHC II-Ii é rapidamente degradado, mas restam ainda fragmentos de CLIP, transitoriamente associados ao MHC II, até que sejam removidos com a ajuda de moléculas semelhantes ao MHC, a HLA-DM (H2-M em camundongos), então ocorre a associação de peptídeos antigênicos com MHC, que serão transportados para a

membrana celular para o reconhecimento pelas células T (VILLADANGOS et al., 2000; GEUZE, 1998).

## 1.6 FOSFATASE ÁCIDA

Fosfatases Ácidas (AcPase) são uma família de enzimas que são diferenciadas de acordo com propriedades estruturais, catalíticas e imunológicas. Três isoenzimas de fosfatases ácidas pertencentes ao grupo de monoesterases ortofosfóricas com pH ótimo ácido, foram identificadas (DREXLER, GIGNAC, 1994). Tem-se a fosfatase ácida prostática que é especificamente expressa e secretada nesta glândula (VINHKO, et al., 1988). A fosfatase ácida lisossomal, sensível à inibição pelo L-tartarato, é encontrada em diferentes células e tecidos (DE ARAÚJO, MIES, ORLANDO, 1976). A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*) é encontrada em células do sistema mononuclear fagocítico (CLARK et al., 1989; HAYMAN, COX, 1994).

Estas enzimas liberam fosfato inorgânico, um metabólito chave para o desenvolvimento celular, a partir de ésteres de fosfato (SUTER et al., 2001). As fosfatases ácidas são hidrolases contidas nos lisossomos, amplamente utilizadas em técnicas citoquímicas como enzimas marcadoras de vesículas do sistema lisossomal e outras organelas de processos relacionados com o sistema endossomal. Entretanto é igualmente claro que ela também ocorre em outros sistemas membranosos das células e na fase solúvel (TEIXEIRA et al., 2001; ALBERTS et al., 1997; OLEA, 1991). Os lisossomos são compartimentos que contém enzimas hidrolíticas utilizadas na digestão intracelular controlada de macromoléculas. Contém vários tipos de hidrolases ácidas responsáveis pela quebra de restos intra e extracelulares, destruição de microrganismos fagocitados e produção de nutrientes para a célula. Nos macrófagos, os lisossomos desempenham a função de digerir material proveniente de fora da célula (heterofagia), e substâncias próprias das células (autofagia) (MEIRELLES, 1983).

A fosfatase ácida é classicamente considerada um critério bioquímico para macrófagos ativados, pois assim como ROS e outras enzimas lisossomais, se encontra aumentada nestas células ativadas, quando comparada com células

residentes (KARNOVSKY, LAZDINS, 1978; GREEN et al., 1994). A função digestiva intervém em numerosos processos biológicos, como a defesa, nutrição dos organismos e involução de órgãos ou tecidos no curso do desenvolvimento (MEIRELLES, 1983).

A TRAP, também conhecida como fosfatase ácida púrpura ou fosfatase ácida tipo 5, distingue-se das outras fosfatases de mamíferos por sua cor característica, baixo pH ótimo (~5), alto ponto isoelétrico (~9) e resistência ao L-tartarato, sendo comumente encontrada em macrófagos e em osteoclastos de mamíferos (LORD et al., 1990; MARSHALL et al., 1997; KAIJA et al., 2002). Estas células possuem uma linhagem comum e ambas geram radicais livres derivados do oxigênio, os quais estão diretamente associados com atividade microbicida e reabsorção óssea, o que confere a estes tipos celulares uma grande taxa de síntese desta enzima (HAYMAN, COX, 1994).

A expressão da TRAP tem sido encontrada aumentada em algumas condições patológicas como a doença de Gaucher (ROBINSON, GLEW, 1980), na reticuloendoteliose leucêmica (LAM, et al. 1976, KETCHAM, et al. 1985), na encefalopatia induzida por HIV (SCHINDELMEISER, et al. 1989), na osteoporose e em outras patologias no metabolismo ósseo (DELMAS, 1992; CHEUNG, et al. 1995).

As funções fisiológicas da TRAP ainda não foram bem esclarecidas. Sugere-se algumas funções à TRAP de macrófagos: funções microbicidas, através da geração de ROS, degradação de material infeccioso, no caso de macrófagos alveolares e a hidrólise de fosfoproteínas de membrana de eritrócitos, no caso de macrófagos esplênicos (MARSHALL et al., 1997). Sugere-se que as atividades fosfatase e geração de ROS da TRAP sejam independentes, mesmo que o sítio ativo utilizado para estas funções seja o mesmo, já que o pH ótimo para a geração de ROS é 6,5, enquanto o pH ótimo para atividade fosfatase é 4,5 (KAIJA et al., 2002).

Tem sido sugerido que a TRAP participe no processamento macromolecular de antígenos, já que é encontrada em células apresentadoras de antígeno derivadas da medula óssea, como macrófagos e células dendríticas (HAYMAN et al., 2000). Esta hipótese é corroborada pela co-localização da TRAP com moléculas MHC II e bactérias fagocitadas, no sistema endossomal/lisossomal tardio (RÄISÄNEN et al., 2001). Estudos histoquímicos, citoquímicos e imunocitoquímicos mostram que a

TRAP está localizada no interior de vesículas do sistema endossoma/lisossoma, vesículas transcitóticas intracelulares nos osteoclastos e na rota de apresentação de antígenos em macrófagos (LAM et al., 1976, CLARK et al., 1989, REINHOLT et al., 1990, HALLEEN et al., 1999, HAYMAN et al., 2000, RÄISÄNEN et al., 2001).

## 1.7 MAGNÉSIO

O magnésio (Mg) é o segundo elemento mais abundante nos sistemas celulares. Ele atua em inúmeras funções biológicas, incluindo o transporte de íons cálcio e potássio, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da integridade do citoesqueleto e mitocôndrias, modula transdução de sinais, metabolismo energético e proliferação celular. O Mg é cofator de inúmeras reações enzimáticas, sendo especialmente importante para enzimas que utilizam nucleotídeos como cofatores ou substratos. Isso ocorre com fosfotransferases e hidrolases, assim como ATPases (HARTWIG, 2001; SARIS et al., 2000).

Foi descrito que o transporte de substratos protéicos intracelulares para os lisossomos é realizado por proteínas da família *heat shock* de 70 kD (hsp70), que necessitam de ATP e  $MgCl_2$ , a *heat shock* cognata de 73 kD (hsc73) constitutivamente expressa no citoplasma (CHIANG et al., 1989) e uma hsp 70 localizada no lúmen lisossomal (ly-hsc73) (AGARRABERES, TERLECKY, DICE, 1997; CUERVO, DICE, KNECHT, 1997). Panjwani e colaboradores mostraram que em macrófagos a expressão de hsc73 coincide com a expressão de moléculas MHC II e que antígenos endocitados por estas células interagem com a hsc73, sendo que esta interação é dependente de ATP (PANJWANI et al., 1999). A hsc73 citosólica, com sua atividade chaperona, reconhece sequências específicas em proteínas que são endereçadas à degradação nos lisossomos. Agarraberes e colaboradores demonstraram em análise de gel bi-dimendional que a ly-hsc 73 corresponde em sua maioria à isoforma ácida da hsc73 citosólica (AGARRABERES, TERLECKY, DICE, 1997).

As ATPases são enzimas de extrema importância na bioquímica celular, principalmente no metabolismo de energia (SARIS et al., 2000). Estas enzimas vêm sendo amplamente utilizadas como marcadoras de membrana plasmática

(CARVALHO, SOUZA, 1989). O citoplasma contém energia nos depósitos de moléculas de triacilglicerídeos (lipídios neutros) e de moléculas de glicogênio. Estas reservas podem ser oxidadas, culminando com a transferência de sua energia para o ATP formado na mitocôndria. As ATPases são enzimas que rompem a ligação química do grupo fosfato terminal do ATP, liberando energia e gerando ADP. O Mg é necessário como cofator para a maioria das ATPases, um baixo nível de Mg prejudica o transporte de K, H, Na, Ca (CARVALHO, SOUZA, 1989).

Devido ao aumento metabólico, os macrófagos ativados necessitam de mais nutrientes e entre esses nutrientes encontram-se os íons. A entrada do íon  $Mg^{++}$  na célula ocorre por difusão, devido a um potencial de membrana negativo no lado citosólico. Como o efluxo de Mg é contra o gradiente eletroquímico, é necessário um mecanismo envolvendo gasto energético para a saída do Mg da célula. Este processo pode ser feito através de antiporte com  $Na^+$ , ou através de um mecanismo de bomba de Mg, dependente de ATP. A  $Mg^{++}$ ATPase, enzima presente na membrana plasmática, permite a saída do íon  $Mg^{++}$  da célula, utilizando a energia liberada pela hidrólise do ATP (BUCHI, SOUZA, 1992; SARIS et al., 2000).

O magnésio possui um papel estabilizador e protetor de membranas, devido à sua carga ( $Mg^{2+}$ ) e a capacidade de inibir a fosfolipase  $A_2$  (SARIS et al., 2000). Possui também, papel fundamental na liberação de óxido nítrico pelas células. Sua deficiência impede a liberação desta substância que possui papel fundamental na prevenção de infecções e vasodilatação (JOHNSON, 2001). Outro aspecto que vem sendo muito discutido é a relação entre a deficiência de Mg e o stress oxidativo. A deficiência de Mg leva animais a apresentarem alterações na resposta imune, são mais suscetíveis ao stress oxidativo e a peroxidação. Ratos com dieta pobre em Mg mostraram uma acelerada involução do timo, acompanhada de apoptose aumentada. Células endoteliais bovinas cultivadas em meio pobre em Mg, apresentaram altos níveis de peroxidação lipídica e danos no processo oxidativo intracelular (DICKENS et al., 1992; RAYSSIGUIER et al., 1993; MALPUECH-BRUGERE, 1999).

## 1.8 CORPOS LIPÍDICOS

Antigamente os lipídios eram vistos como unidades estruturais inativas da membrana, só recentemente eles foram reconhecidos como importantes moléculas na transmissão e regulação da sinalização celular. Agem como precursores e também atuam diretamente como mensageiros na transmissão de sinais gerados na superfície celular pela ligação de um agonista com o receptor. É uma importante classe de segundos mensageiros (JACKSON, 1997).

A maioria dos organismos transporta ou estoca lipídios neutros como corpos lipídicos, inclusões citoplasmáticas não ligadas à membrana que variam muito em sua morfologia (MURPHY, VANCE, 1999). Os corpos lipídicos são estruturas morfológicamente distintas e podem ser identificadas por microscopia eletrônica e de luz utilizando-se coloração específica. São gotículas esferoidais que variam de 0,1 a 50  $\mu\text{m}$ , envolvidas por uma monocamada de fosfolipídios com algumas proteínas específicas. Entre os lipídios contidos nestas organelas estão principalmente triacilgliceróis, diacilgliceróis (em alguns tecidos de insetos) e ésteres de colesterol (MELO et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais os corpos lipídicos são gerados nas plantas, animais e microorganismos parecem ter em comum sua origem em microdomínios específicos do retículo endoplasmático (ou na membrana plasmática dos procariotos), que contém enzimas de biosíntese de lipídios (MURPHY, VANCE, 1999).

Os corpos lipídicos representam uma característica morfológica da participação celular no processo de resposta inflamatória. São constituintes normais de muitos tipos celulares, incluindo neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos. A principal função destas partículas é armazenar lipídios neutros como fonte de energia, de componentes necessários a biogênese de membranas e componentes lipofílicos específicos, como hormônios esteróides (MELO et al., 2003).

Estudos sobre a formação de corpos lipídicos e seus papéis na inflamação têm mostrado que os corpos lipídicos podem atuar como organelas intracelulares dinâmicas. O número e o tamanho destes corpos lipídicos aumentam

significativamente quando as células participam de processos inflamatórios, tendo sido reconhecidos como domínios intracelulares especializados, envolvidos na formação de mediadores parácrinos da inflamação (eicosanóides), em células envolvidas em reações inflamatórias (MELO et al., 2003). Foi observado que o número de corpos lipídicos aumenta em eosinófilos e em outros leucócitos quando estes participam de reações inflamatórias (ZWEYTICK, ATHENSTAEDT, DAUM, 2000). Enquanto alguns macrófagos podem conter relativamente poucos corpos lipídicos, esses são caracteristicamente abundantes em macrófagos (e outras células) envolvidos em inflamações, aterosclerose e neoplasias (MURPHY, 2001). Em 1983 em macrófagos alveolares humanos foi observada a associação de corpos lipídicos com a rede de filamentos intermediários. O estímulo da fagocitose nestas células resultou no movimento destes corpos lipídicos para as proximidades dos fagolisossomas, dentro dos quais eles descartam seu conteúdo. Macrófagos são importantes sítios do metabolismo de ácido araquidônico, os produtos deste são potentes mediadores biológicos. Os derivados da oxidação do ácido araquidônico incluem eicosanóides como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas que são produzidas via cicloxigenase (COX), assim como leucotrienos e hidroxi/hidroperoxi ácidos graxos resultantes da via da lipoxigenase (LOX). Esses mediadores possuem papéis importantes em diversos processos celulares como inflamação, imunidade e homeostase (DVORAK, 1983). O possível papel dos corpos lipídicos na formação de eicosanóides é corroborado pelo fato de enzimas relacionadas a formação destes, como a fosfolipase A<sub>2</sub>, COX, MAP (mitogen-activated protein) quinases, LOX, leucotrieno C<sub>4</sub> sintase, prostaglandina endoperoxídeo sintase e prostaglandina H sintase terem sido encontradas associadas ou contidas em corpos lipídicos (DVORAK et al., 1992; DVORAK et al., 1992; DVORAK et al., 1994; BOZZA et al., 1997; BOZZA et al., 1998; YU et al., 1998; WELLER, DVORAK, 1994).



## 2. JUSTIFICATIVA

A maioria dos tratamentos médicos é efetivo no controle das doenças, porém muitas vezes produz efeitos colaterais indesejados. A homeopatia é um método de tratamento que de maneira geral não apresenta toxicidade, fazendo com que esta especialidade médica seja cada vez mais utilizada. No entanto a homeopatia ainda carece de estudos científicos que esclareçam seus mecanismos de ação e comprovem sua eficácia.

O medicamento homeopático Canova vem sendo utilizado com sucesso no tratamento de pacientes com câncer e AIDS. Alguns desses pacientes utilizam apenas o medicamento Canova, enquanto outros fazem o uso dessa medicação concomitantemente ao tratamento alopático usual recomendado à suas respectivas doenças (quimioterápicos e anti-retrovirais). Relatos de médicos e pacientes usuários da medicação confirmam a eficácia clínica do tratamento. Relatam melhora nos sintomas e principalmente na qualidade de suas vidas, além de amenizar os efeitos colaterais dos demais medicamentos, quando estes são utilizados em conjunto.

Nosso laboratório deu início a estudos celulares e moleculares com o medicamento Canova, a fim de aumentar o conhecimento dos mecanismos de ação deste medicamento. Hoje, através destes estudos, sabemos da sua atuação na ativação de macrófagos. No entanto as vias de atuação do medicamento através destas células ainda não são totalmente conhecidas.

Neste trabalho pretende-se dar continuidade aos experimentos já realizados com o medicamento Canova, a fim de obter um maior número de informações que contribuam para o esclarecimento de seu mecanismo de ação.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

- Avaliar os efeitos do medicamento Canova sobre a atividade de macrófagos peritoneais de camundongo.

#### **Objetivos específicos**

- Avaliar possíveis alterações ultraestruturais nos macrófagos tratados com Canova com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- Detectar a atividade das enzimas  $Mg^{++}$  ATPase, fosfatase ácida e TRAP, utilizando técnicas de citoquímica;
- Observar os corpos lipídicos, com o auxílio da microscopia confocal e eletrônica de transmissão;
- Avaliar a atividade fagocítica dos macrófagos tratados com Canova em microscopia eletrônica, óptica e confocal, observando possíveis alterações na atividade da enzima fosfatase ácida e na localização de corpos lipídicos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Utilizou-se como modelo biológico, camundongos albinos suíços, machos, da espécie *Mus musculus*, linhagem Rockefeller, com idade de 3 meses, pesando entre 40 e 60g, os quais foram gentilmente cedidos pelo biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

### 4.2 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais, foi feita a coleta do lavado intraperitoneal dos camundongos. Estes foram anestesiados através da inalação de éter etílico, para posterior eutanásia por meio de deslocamento cervical. Imediatamente após o óbito, foi realizada a secção da pele abdominal para a exposição do peritônio. Foi injetado na cavidade peritoneal 10 mL de solução de PBS estéril pH 7,4, a 4°C. O peritônio foi então massageado para que ocorresse o desprendimento das células e o lavado peritoneal retirado com auxílio de uma seringa e armazenados à 4°C até o plaqueamento (PIEMONTE e BUCHI, 2002).

### 4.3 CULTIVO CELULAR

Os macrófagos foram cultivados em garrafas ou placas de cultivo de 24 poços, estéreis, com o número de células necessárias para cada experimento. O lavado intraperitoneal foi mantido em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 15 minutos para a adesão dos macrófagos nas paredes da garrafa ou sobre as lamínulas previamente distribuídas nas placas de cultivo. Após este tempo, as células não aderentes foram descartadas e se adicionou meio de cultura DMEM a 37°C suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico (penicilina 1 U/mL, estreptomicina 1 µg/mL, e anfotericina 2,5µg/L). As células permaneceram em cultura por um período de 48 horas (PIEMONTE e BUCHI, 2002).

#### 4.4 GRUPOS DE TRATAMENTO

As análises foram realizadas em camundongos (experimentos *in vivo*) e em macrófagos cultivados (item 4.3) (experimentos *in vitro*),

Os experimentos envolveram três grupos de tratamento:

- Grupo Controle: sem qualquer tratamento
- Grupo Diluente: tratamento com solução hidroalcoólica 0,01% utilizada na preparação do medicamento.
- Grupo Tratado: tratamento com o medicamento Canova.

Todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições ambientais controladas.

##### 4.4.1 TRATAMENTO *IN VIVO*

O tratamento dos animais ocorreu durante 7 dias com a administração de solução hidroalcoólica ou Canova sucussionado (3 $\mu$ L/g), em seus respectivos grupos, através de injeções subcutâneas a cada 24 horas. Após o período de 7 dias, as células foram coletadas e cultivadas por 24 horas (item 4.3) para posterior utilização em procedimentos experimentais (PIEMONTE e BUCHI, 2002).

##### 4.4.2 TRATAMENTO *IN VITRO*

As células foram tratadas, de acordo com seus respectivos grupos, adicionando-se ao meio de cultura 10% da medicação sucussionada ou diluente em relação ao meio, após as 3 primeiras horas de cultivo. Uma segunda dose do tratamento, na concentração de 1% em relação ao meio, foi administrada passadas 24 horas de cultivo (PIEMONTE e BUCHI, 2002).

#### 4.5 *Saccharomyces cerevisiae*

Os exemplares de *S. cerevisiae* (leveduras) foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo alíquotas do estoque separadas e descongeladas para a utilização em cada experimento.

Durante o processo de preparação, as leveduras foram diluídas e homogeneizadas em 10ml de PBS (pH 7.4), sendo então lavadas 2 vezes por centrifugação (2000 rpm/5 min). O sobrenadante foi desprezado e substituído a cada etapa. Após a lavagem, o número de leveduras contidas na solução foi determinado através de contagem em Câmara de Neubauer. Após a contagem, os microrganismos foram centrifugados até que fosse obtido um precipitado celular, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultura sem SFB. A concentração final da solução foi calculada para que o número de leveduras (10:1) a ser adicionado em cada experimento estivesse contido em 200  $\mu\text{l}$  de meio de cultura (BUCHI *et al*, 1993).

#### 4.6 INTERAÇÃO LEVEDURA -MACRÓFAGOS

Após cultivo celular em placa de cultura de 24 poços, por um período de 48 horas, os macrófagos foram lavados 5 vezes com meio de cultura sem SFB e as leveduras adicionadas, na proporção de 10:1 em relação ao número de macrófagos ( $10^5$  células/poço). As placas de cultivo foram então incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , com atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 2 horas (CARVALHO *et al*, 1999).

Após o período de interação as células foram fixadas, conforme o determinado para cada experimento.

#### 4.7 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL COM TRATAMENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ENZIMA $\text{Mg}^{++}$ ATPASE

Os animais foram tratados para os experimentos *in vivo*, seus macrófagos coletados e cultivados por 24 horas, segundo método descrito anteriormente (itens

4.2, 4.3 e 4.4.1). Nos experimentos com tratamento *in vitro*, os macrófagos foram tratados em cultura de 48 horas (itens 4.2, 4.3 e 4.4.2).

Os macrófagos foram incubados em meio adequado à atividade da enzima  $Mg^{++}$  ATPase de acordo com a metodologia descrita no ANEXO 1. O meio de incubação continha o substrato da enzima (ATP), o cofator (Sulfato de Magnésio) e o agente de captura (Cloreto de Cério). O Cério se complexa com o fosfato e forma um precipitado eletrondenso, o fosfato de cério, facilmente visualizável no microscópio eletrônico. Além dos grupos de tratamento, neste experimento foi adicionado o grupo controle da enzima (ANEXO 1). Neste grupo não foi adicionado o substrato da enzima, para que se pudesse garantir a especificidade da marcação. Após incubação as células foram fixadas segundo Karnovsky (1965) e após a fixação, as células foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão e observadas sem contrastação (ANEXO 2) (BUCHI *et al*, 1993).

#### 4.8 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL *IN VIVO* E *IN VITRO* DA ENZIMA AcPase

Os animais foram tratados para os experimentos com tratamento *in vivo*, seus macrófagos coletados e cultivados por 24 horas, segundo método descrito anteriormente (itens 4.2, 4.3 e 4.4.1). Nos experimentos com tratamento *in vitro*, os macrófagos foram tratados em cultura de 48 horas (itens 4.2, 4.3 e 4.4.2).

Os macrófagos foram incubados em meio adequado à enzima AcPase. Após incubação, sempre se respeitando os grupos de tratamento, as células foram então fixadas segundo Karnovsky (1965) (ANEXO 3). O meio de incubação continha o substrato da enzima ( $\beta$ -Glicerofosfato) e o agente de captura (Cloreto de Cério). O Cério se complexa com o fosfato e forma um precipitado eletrondenso, o Fosfato de Cério, facilmente visualizável no microscópio eletrônico. Além dos grupos de tratamento, neste experimento foi realizado um grupo controle da reação enzimática. Neste grupo não foi adicionado o substrato da enzima, no entanto adicionou-se Fluoreto de Sódio (inibidor da AcPase) para que se pudesse garantir a especificidade da marcação (JAMUR, VUGMAN e HAND, 1986; ROBINSON e

KARNOVSKY, 1983). Após a fixação, as células foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão e observadas sem contrastação (ANEXO 2).

#### 4.9 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL PARA DETECÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS

Os animais foram tratados de acordo com o item 4.2, sacrificados, seus macrófagos coletados e cultivados por 48 horas (itens 4.3 e 4.4). De cada grupo foram analisados macrófagos com (Item 4.6) e sem interação com leveduras. O grupo sem interação com levedura foi submetido as mesmas condições do grupo com leveduras, no entanto sem a adição das mesmas.

Os macrófagos foram fixados com glutaraldeído e pós-fixados com o complexo Ósmio-Imidazol (ANEXO 4). O imidazol penetra rapidamente nas células e facilita a interação da molécula do tetróxido de ósmio com os lipídios insaturados, contrastando fortemente as inclusões lipídicas. Posteriormente à pós-fixação, segue-se com o procedimento de rotina para microscopia eletrônica de transmissão, com contrastação em citrato de chumbo (ANEXO 2) (DE SOUZA, et al., 1998; ANGERMÜLLER e FAHIMI, 1982).

#### 4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A fixação foi realizada de acordo com o descrito nos diferentes experimentos, em Karnovsky ou glutaraldeído. As células foram raspadas das garrafas de cultura, coletadas e centrifugadas. Foi feita então, a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 2 mM, desidratação em acetona, infiltração em mistura de epon:acetona em série decrescente e a emblocagem feita em epon. Após a polimerização do epon em estufa à 60°C, os blocos foram cortados em ultramicrótomo e observados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Foram observados cortes de células pescados em gradinhas de cobre de 300 mesh. Estes foram obtidos através de cortes aleatórios, em intervalos de 0,5 $\mu$  (ANEXO 2).

#### 4.11 CITOQUÍMICA PARA ENZIMA ACPASE TOTAL E TRAP

Para verificar a atividade da enzima AcPase total e da TRAP, foram realizados experimentos com macrófagos cultivados em placas de 24 poços, contendo lamínulas, por 48 horas, com e sem interação com leveduras, segundo método descrito anteriormente. Utilizou-se o "Sigma Diagnostics Acid Phosphatase Kit " (SIGMA - nº386A), segundo instruções do fabricante (ANEXO 5). As células foram observadas e fotografadas no fotomicroscópio Olympus PM10AD.

#### 4.12 MICROSCOPIA CONFOCAL DE CORPOS LIPÍDICOS

Os macrófagos foram coletados, tratados e cultivados, em placas de cultura contendo lamínulas no interior de seus 24 poços, por 48 horas com e sem interação com leveduras, segundo métodos descritos em itens anteriores.

O fluoróforo, Vermelho Nilo (Sigma<sup>®</sup>), que cora lipídios neutros intracelulares foi utilizado para analisar o conteúdo lipídico intracelular em microscopia confocal. Após o cultivo, as lamínulas que continham as células aderidas, foram fixadas em paraformaldeído 1%, lavadas em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M - pH 7,2, coradas com Vermelho Nilo (1µg/mL) por 10 minutos, lavadas novamente com o tampão e observadas em microscópio confocal Radiance 2001 (Bio-Rad<sup>®</sup>) acoplado à Eclypse E-800 (Nikon<sup>®</sup>). Foi utilizada objetiva com lente de imersão plana-apocromática 60X/1.4 NA e microscopia de interferência diferencial por contraste (DIC) para análise das células. O Vermelho Nilo foi excitado utilizando-se o laser Verde HeNe de 543nm e a imagem foi obtida utilizando-se o filtro de emissão E600LP.



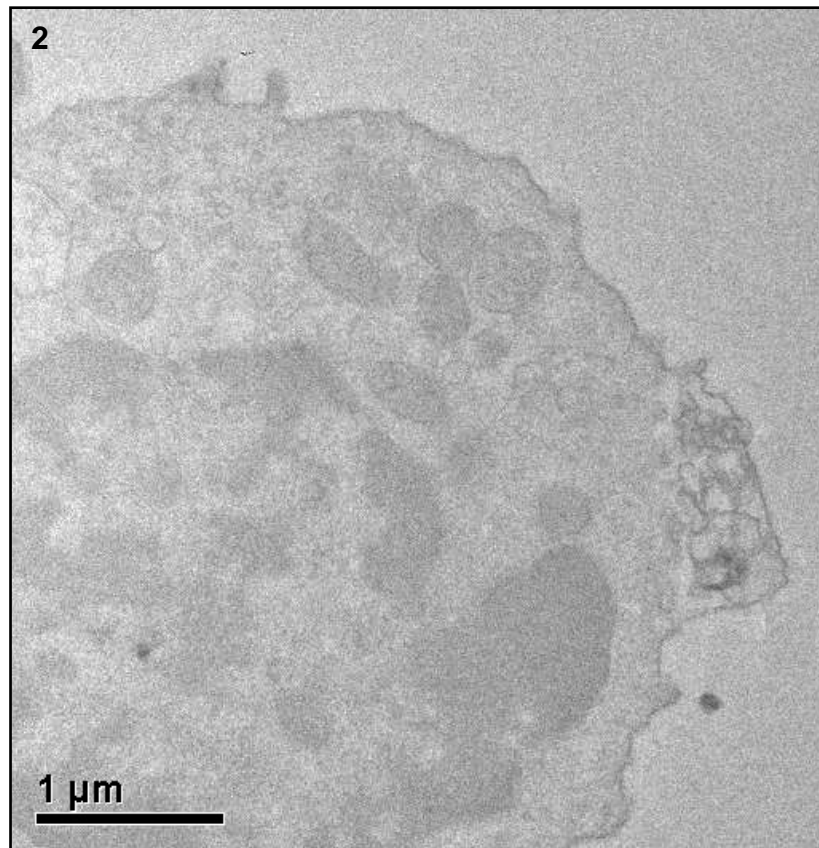
## 5. RESULTADOS

Foram realizados experimentos com três grupos de controle, sem tratamento, tratamento com solução hidroalcoólica e controle da reação citoquímica. Os resultados referentes às células do grupo diluente de todos os experimentos, tanto dos grupos *in vivo* como *in vitro*, foram sempre semelhantes ao grupo controle sem adição de nenhuma substância. Desta forma serão apresentados apenas resultados como sendo do grupo controle do tratamento, grupo tratado e grupo controle da reação citoquímica.

### 5.1 FOSFATASE ÁCIDA

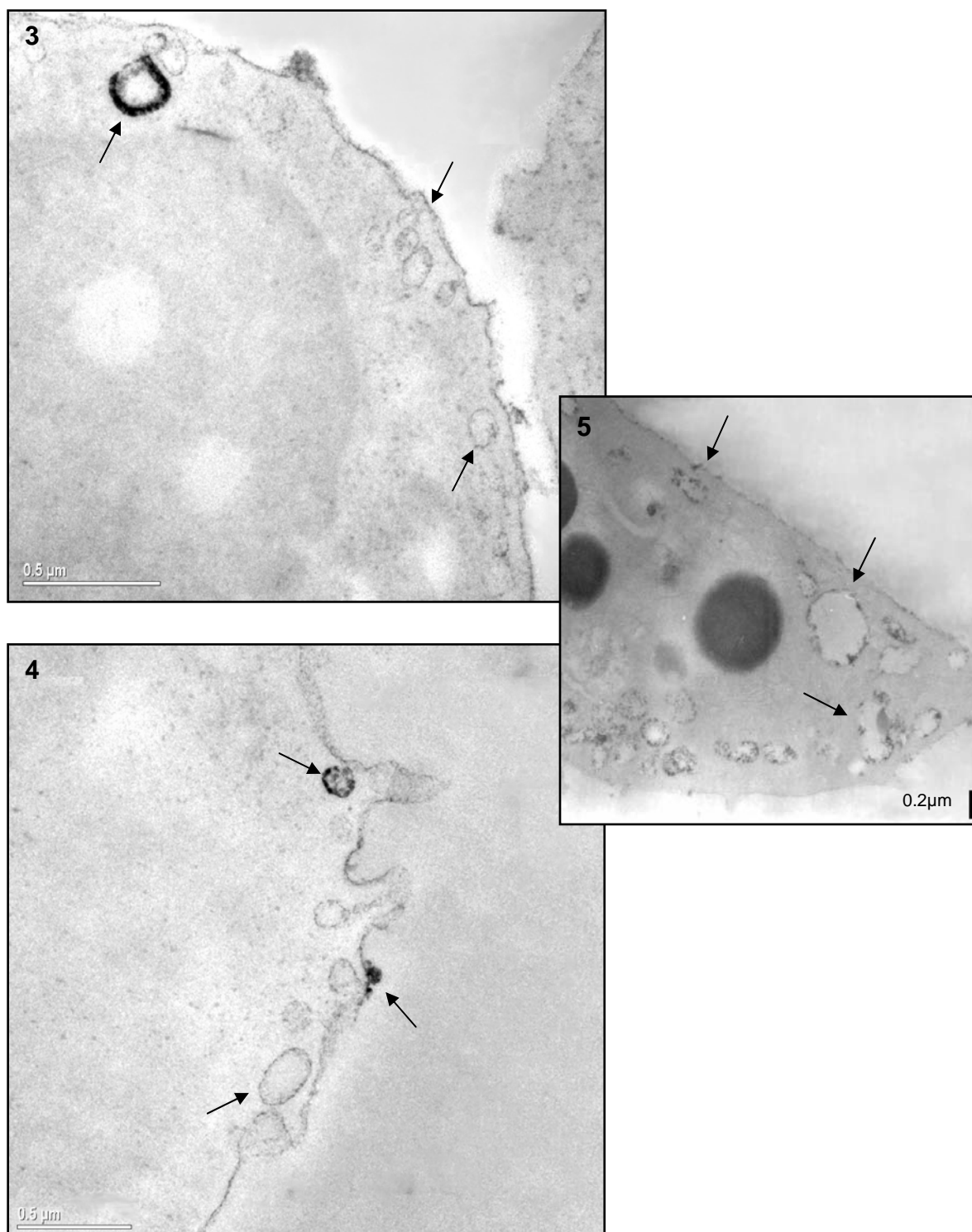
#### 5.1.1 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL

Nos experimentos em que as células foram tratadas *in vitro*, os resultados mostraram-se semelhantes a experimentos onde foi feito o tratamento *in vivo* dos animais. Os macrófagos apresentaram reação positiva para a citoquímica da enzima fosfatase ácida (AcPase), tanto no grupo tratado com Canova como no grupo controle do tratamento. A especificidade da reação foi comprovada com o controle da enzima (figura 2) que não recebeu o substrato da enzima ( $\beta$ -Glicerofosfato), portanto não formando precipitado eletrondenso de Fosfato de Cério. O grupo tratado (figuras 6, 7 e 8) apresentou marcação mais intensa e maior número de compartimentos, quando comparada com o grupo controle (figuras 3, 4 e 5).



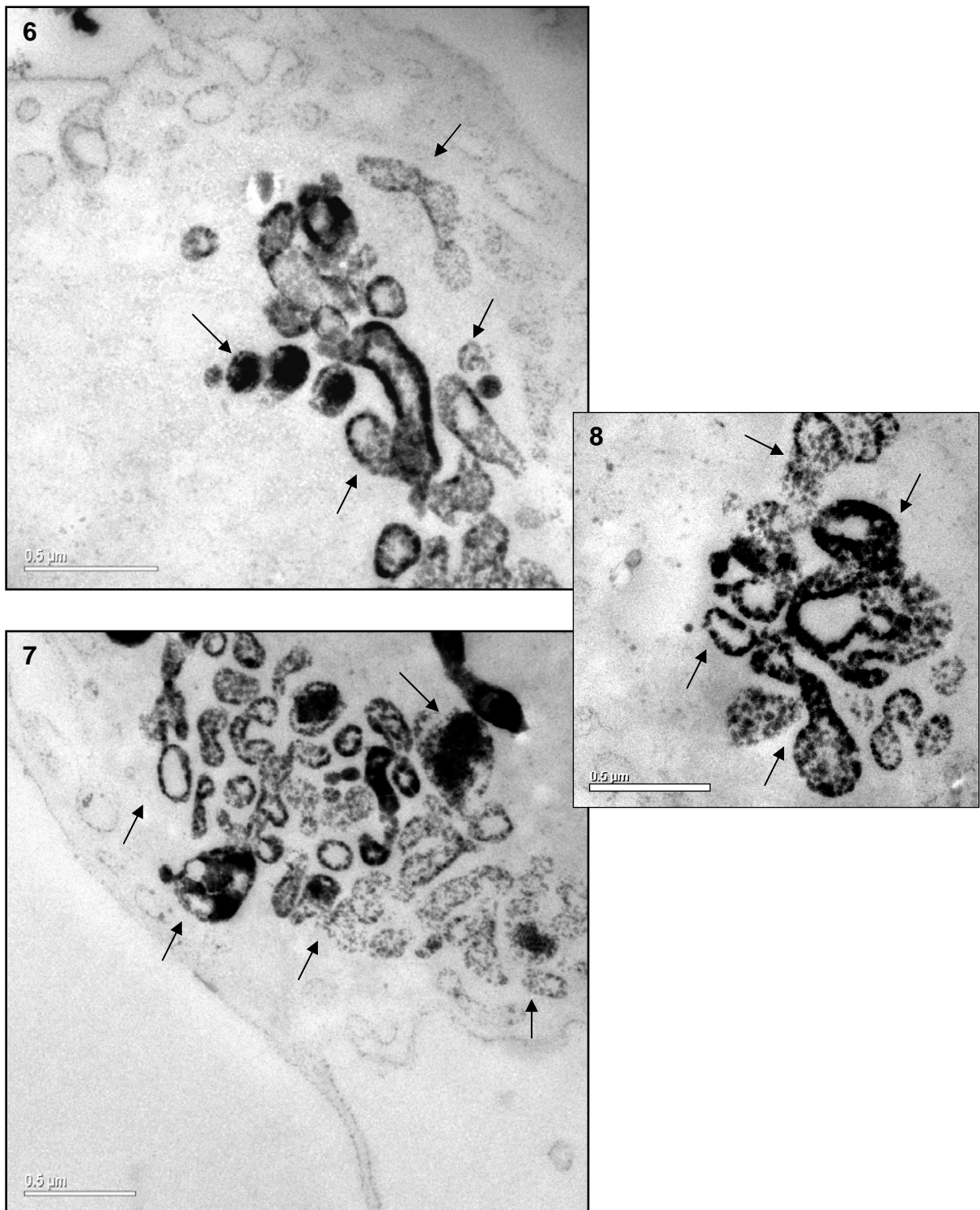
**FIGURA 2: Fosfatase ácida - grupo controle da enzima.**

Macrófago peritoneal de camundongo, processada sem o substrato da enzima AcPase. Não foi observado precipitado eletrondenso para este grupo de células.



**FIGURAS 3 e 4: Fosfatase ácida - grupo controle do tratamento - experimento *in vivo*.** Macrófagos peritoneais de camundongos contendo leve marcação eletrondensa para a enzima na superfície celular e em vesículas do sistema endossoma/lisossoma.

**FIGURA 5: Fosfatase ácida - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.** Resultado semelhante ao tratamento *in vivo*.  
Setas: marcação eletrondensa positiva para a AcPase.



**FIGURAS 6 e 7: Fosfatase ácida - grupo tratado com Canova - tratamento *in vivo*.** Macrófagos peritoneais de camundongos com aspecto de células ativadas, mostrando muitas vesículas do sistema endossoma/lisossoma intensamente marcadas.

**FIGURA 8: Fosfatase ácida - grupo tratado com Canova - tratamento *in vitro*.** Resultado semelhante ao tratamento *in vivo*.  
Setas: marcação eletrondensa positiva para a AcPase.

### 5.1.2 CITOQUÍMICA EM MICROSCOPIA DE LUZ

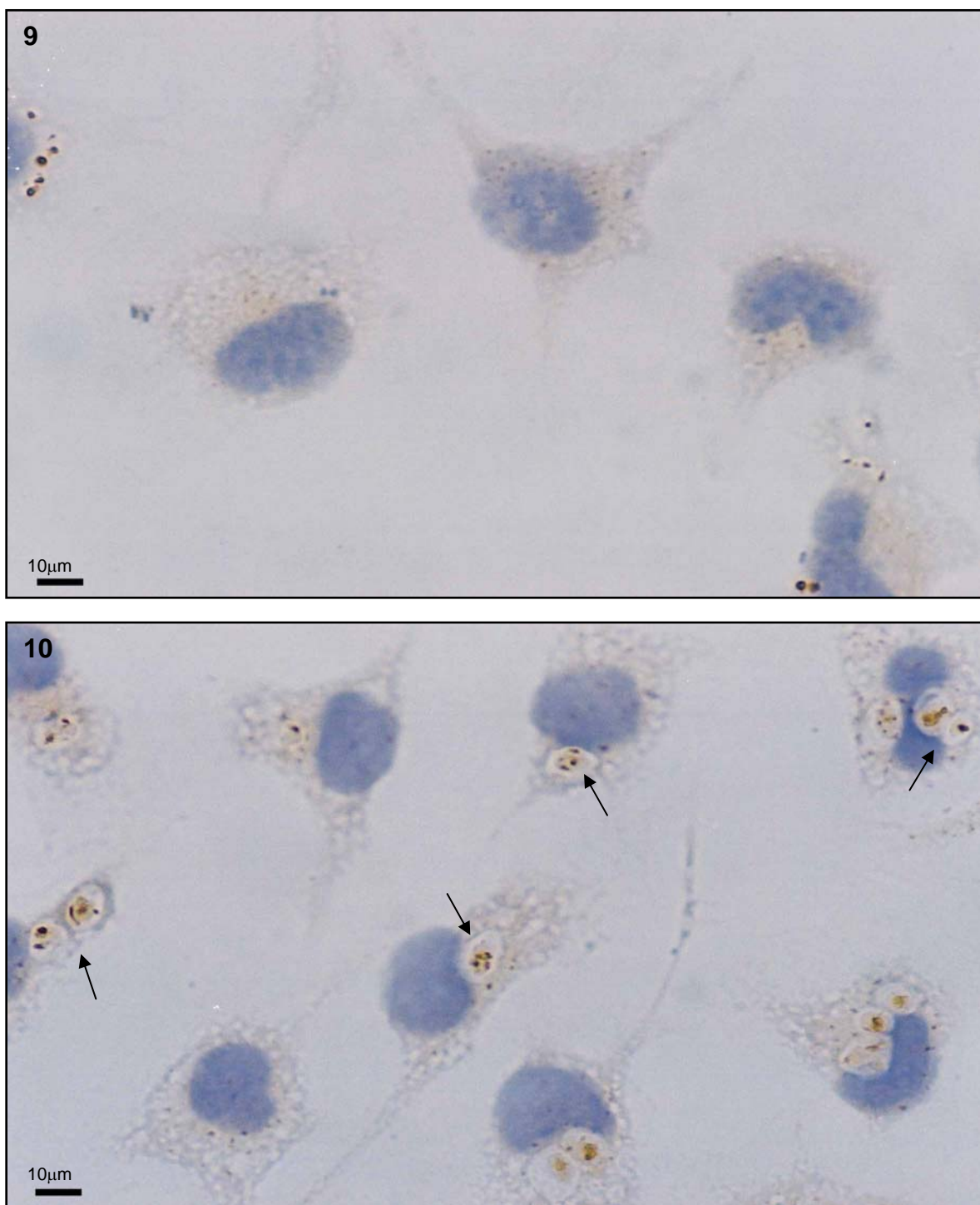
Os macrófagos apresentaram reação positiva para a citoquímica da enzima AcPase, tanto no grupo tratado como no grupo controle, na interação ou não com leveduras. A especificidade da reação foi comprovada com os grupos controle da enzima (incubado em meio sem substrato e com o inibidor fluoreto) com (figura 9) e sem levedura (figura 10), os quais não apresentaram marcação.

Na análise dos grupos controle e tratado *in vitro* com Canova, percebe-se clara diferença morfológica entre os grupos. No grupo controle (figuras 11 e 12) encontra-se muito mais células com aspecto de macrófagos residentes: células menores, com poucos vacúolos e pouco espalhadas. No grupo tratado (figuras 13 e 14) observa-se macrófagos com aspecto de ativados, células maiores com muitos vacúolos e bastante espalhadas.

Observando-se a marcação de cor avermelhada, específica para a enzima fosfatase ácida total nota-se que em ambos os grupos a AcPase está distribuída em toda a célula, embora seja encontrada em maior quantidade no grupo tratado com Canova (figuras 13 e 14). Quando os macrófagos dos grupos controle e tratado são colocados para interagir durante 2 horas com leveduras, a situação se repete. A marcação para AcPase de maneira geral é mais intensa no grupo tratado (figura 21 e 22), se comparado ao controle (figura 19 e 20). Macrófagos interagindo com leveduras, independente do grupo, de maneira geral apresentam maior quantidade de marcação que macrófagos que não entraram em contato com leveduras. O número de leveduras fagocitadas também é maior nos macrófagos do grupo tratado, repetindo os resultados encontrados por Godoy (GODOY, 2002). Observa-se ainda uma redução da marcação em alguns macrófagos contendo maior quantidade de leveduras.

Observando-se a marcação de cor marrom, específica para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) nota-se que em ambos os grupos, a TRAP está dispersa por todo o citoplasma, embora seja encontrada em maior quantidade no grupo controle (figuras 15 e 16) que no grupo tratado (figuras 17 e 18). Quando os macrófagos dos grupos controle e tratado são colocados para interagir durante 2 horas com leveduras, a situação se repete. A marcação para

TRAP de maneira geral é maior no grupo controle (figura 23 e 24), se comparado ao tratado (figura 25 e 26). Observa-se grande quantidade de marcação também no interior das leveduras nos dois grupos, dando às vezes impressão de maior marcação no grupo tratado, já que estes macrófagos fagocitam mais leveduras.

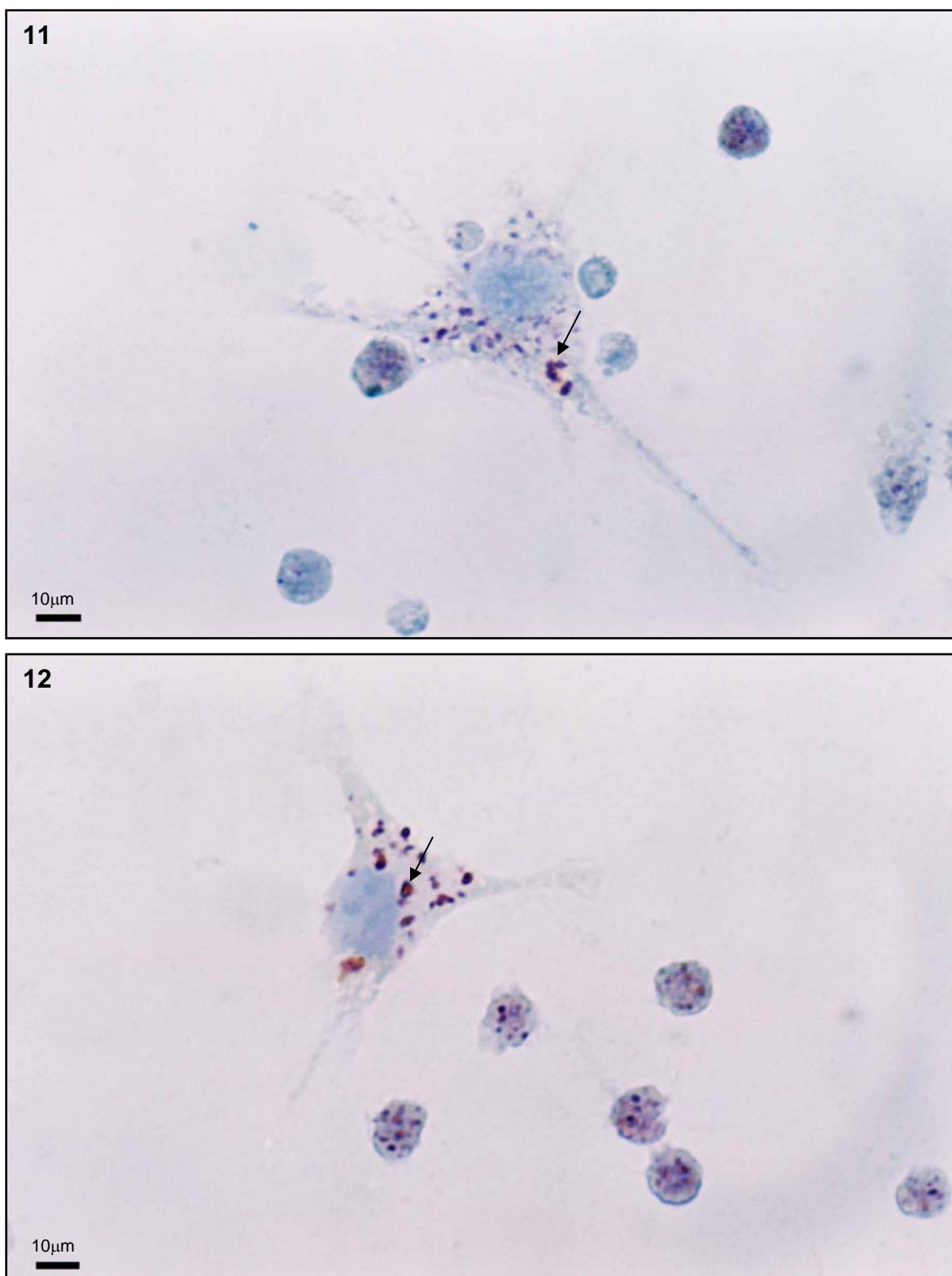


**FIGURAS 9 e 10: AcPase total e TRAP - grupo controle da enzima - experimento *in vivo*.**

Macrófagos peritoneais de camundongos, não foi observada marcação positiva para este grupo de células processadas como grupo controle da reação das enzimas AcPase total e TRAP.

FIGURA 10: interação com leveduras.

Seta: leveduras fagocitadas.

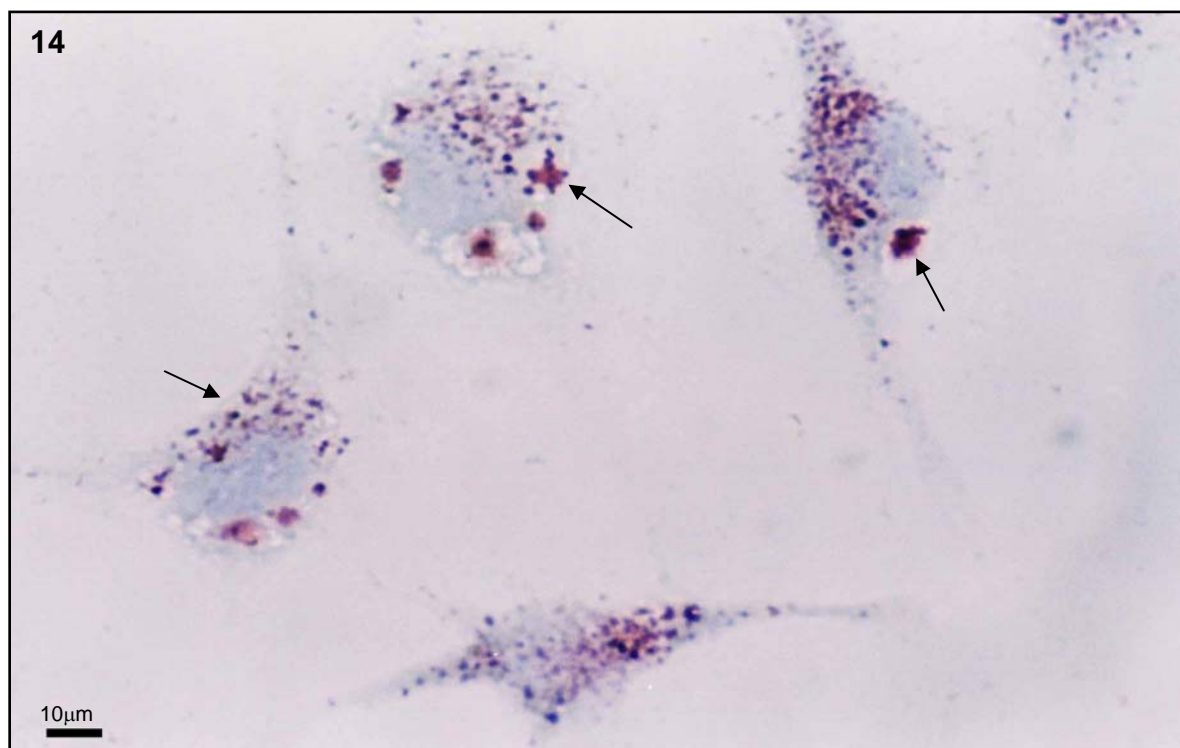
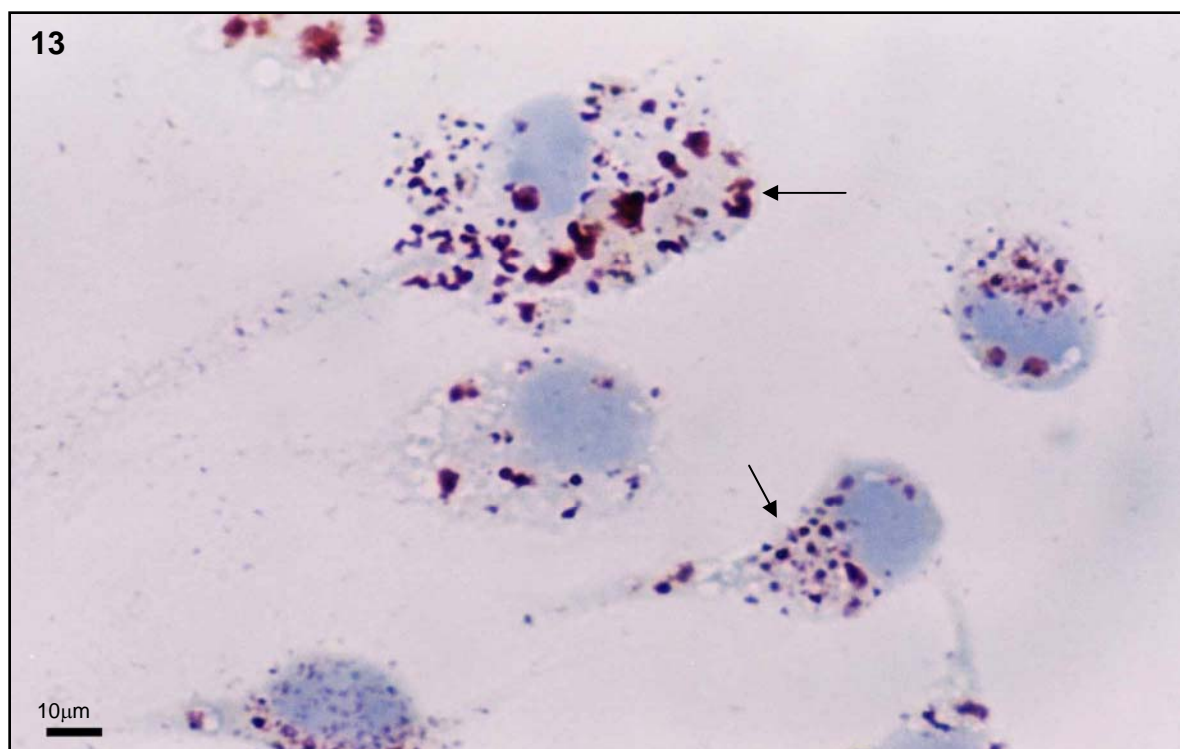


**FIGURAS 11 e 12: Fosfatase ácida - em grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.**

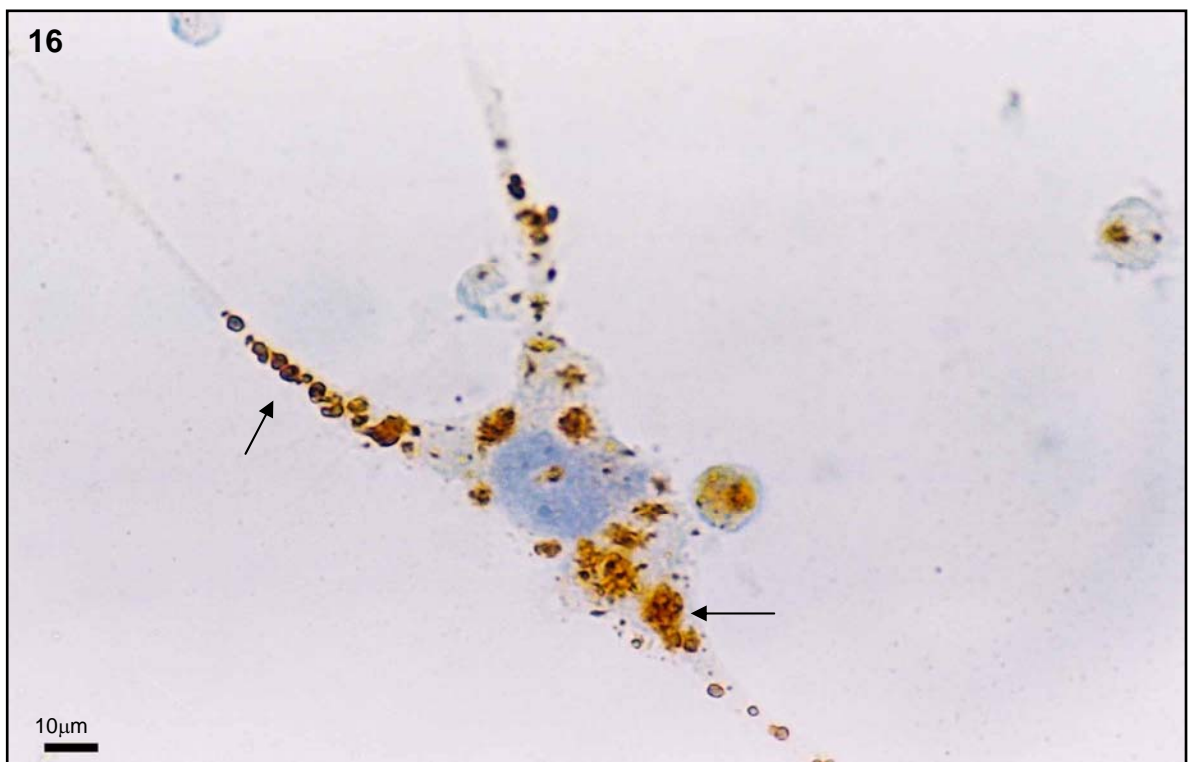
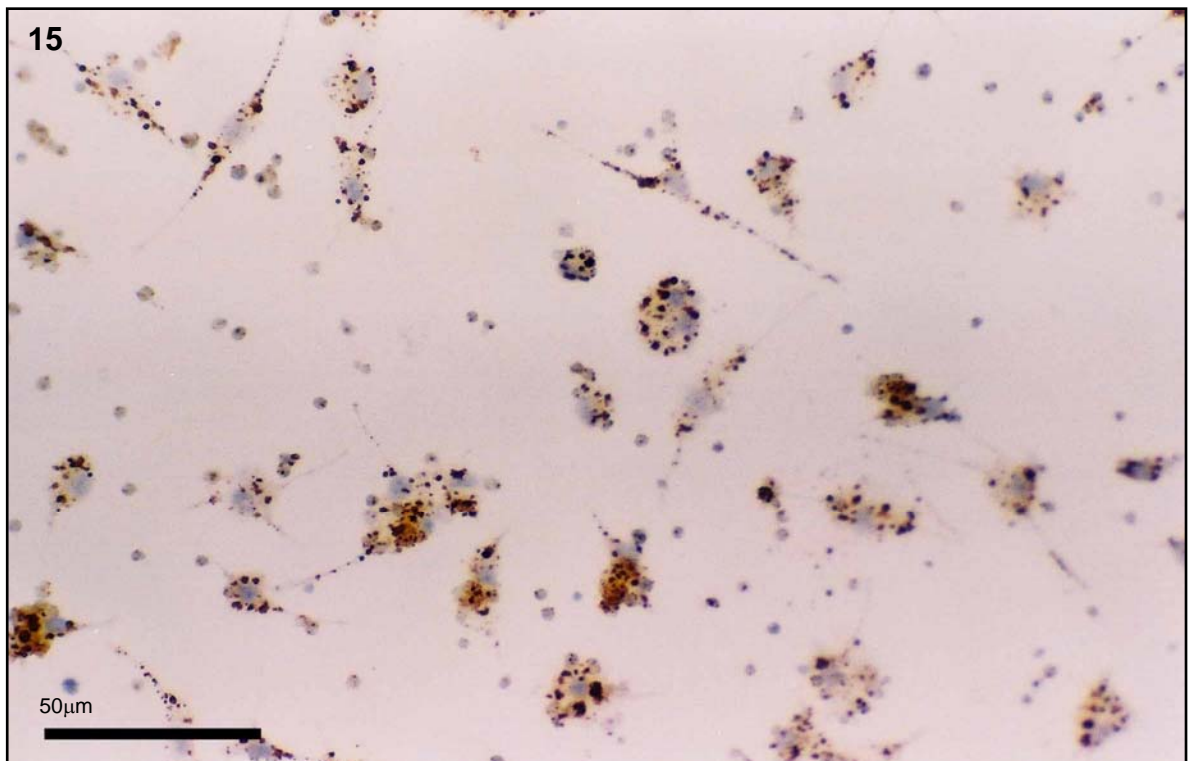
Células contendo marcação específica para a enzima.

Seta: marcação de cor avermelhada, distribuída no citoplasma.





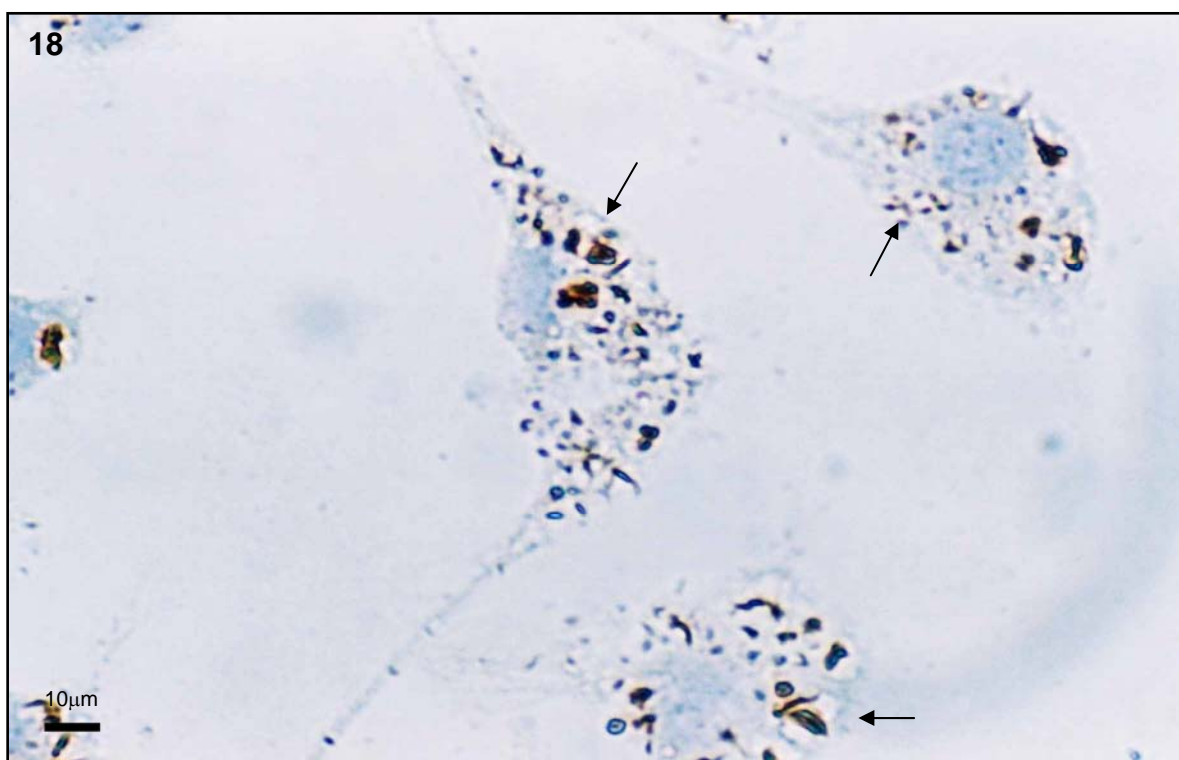
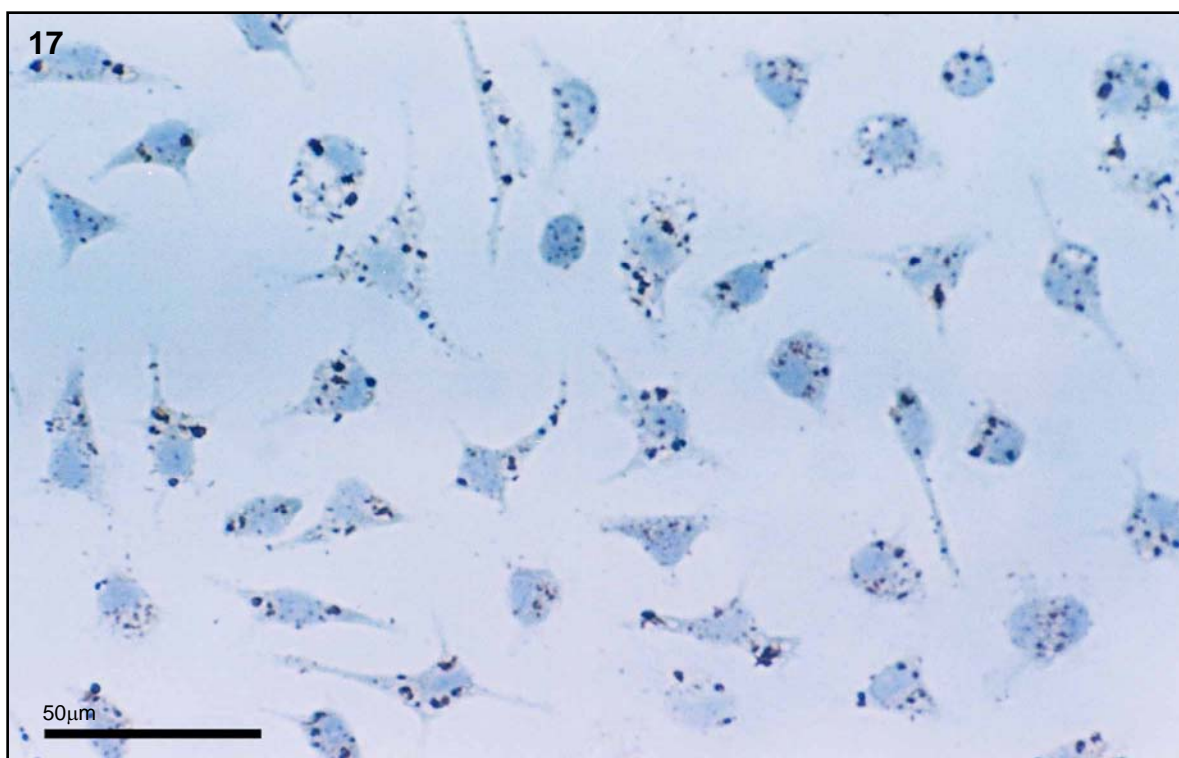
**FIGURAS 13 e 14: Fosfatase ácida - grupo tratado com Canova - tratamento *in vitro*.** Macrófagos peritoneais de camundongo maiores e mais espalhados, contendo marcação específica para a AcPase, em maior quantidade se comparada com o grupo controle do tratamento. Seta: marcação de cor avermelhada, específica da reação enzimática.



**FIGURAS 15 e 16: TRAP - grupo controle do tratamento - experimento in vitro.**

Macrófagos peritoneais de camundongos contendo intensa marcação específica para a enzima TRAP.

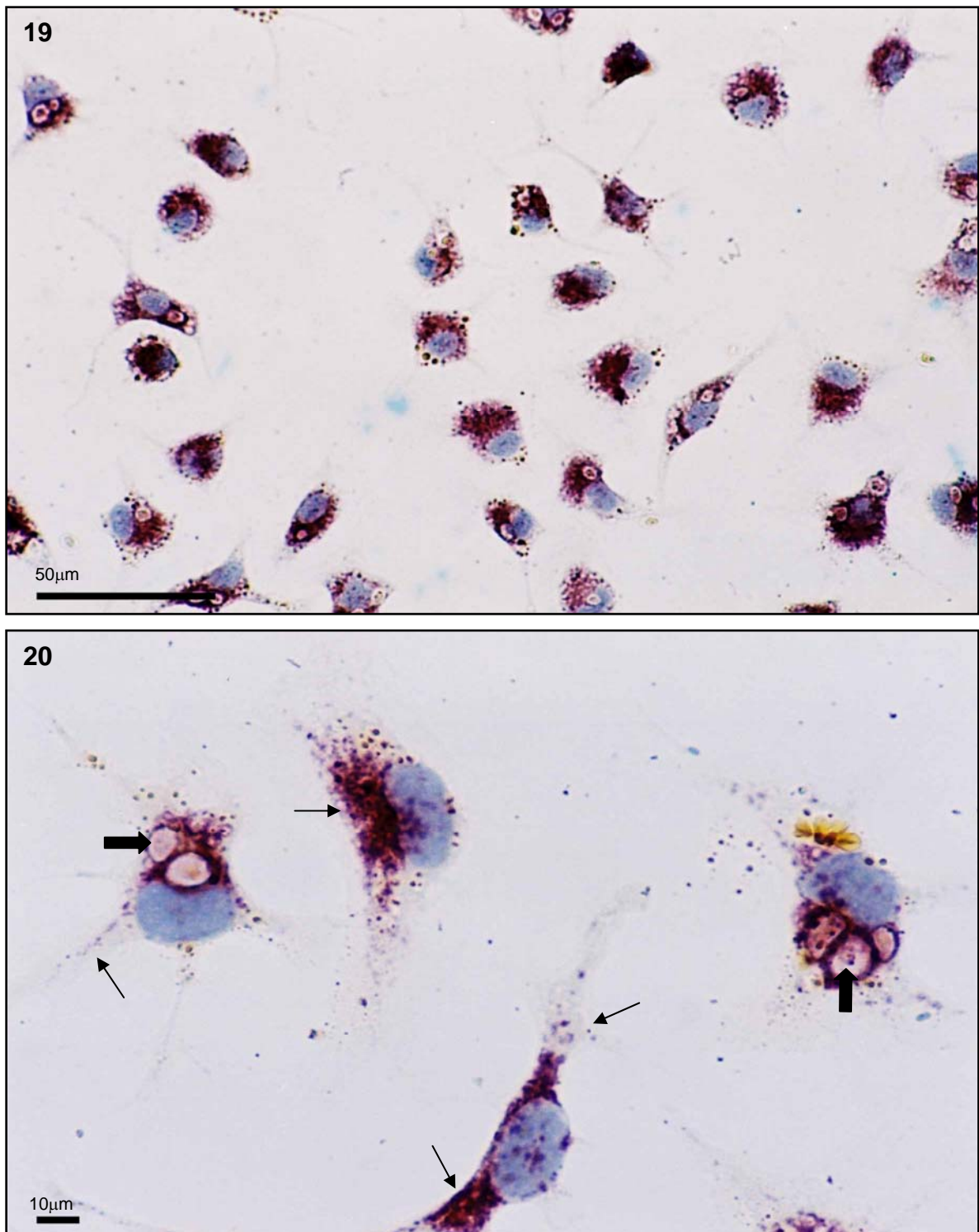
Seta: marcação de cor marrom, indicando a reação enzimática.



**FIGURAS 17 e 18: TRAP - grupo tratado com Canova - experimento *in vitro*.** Macrófagos peritoneais de camundongos contendo marcação específica para a enzima em menor quantidade que a encontrada no controle (figuras 15 e 16).

Seta: marcação de cor marrom, indicando a reação enzimática.

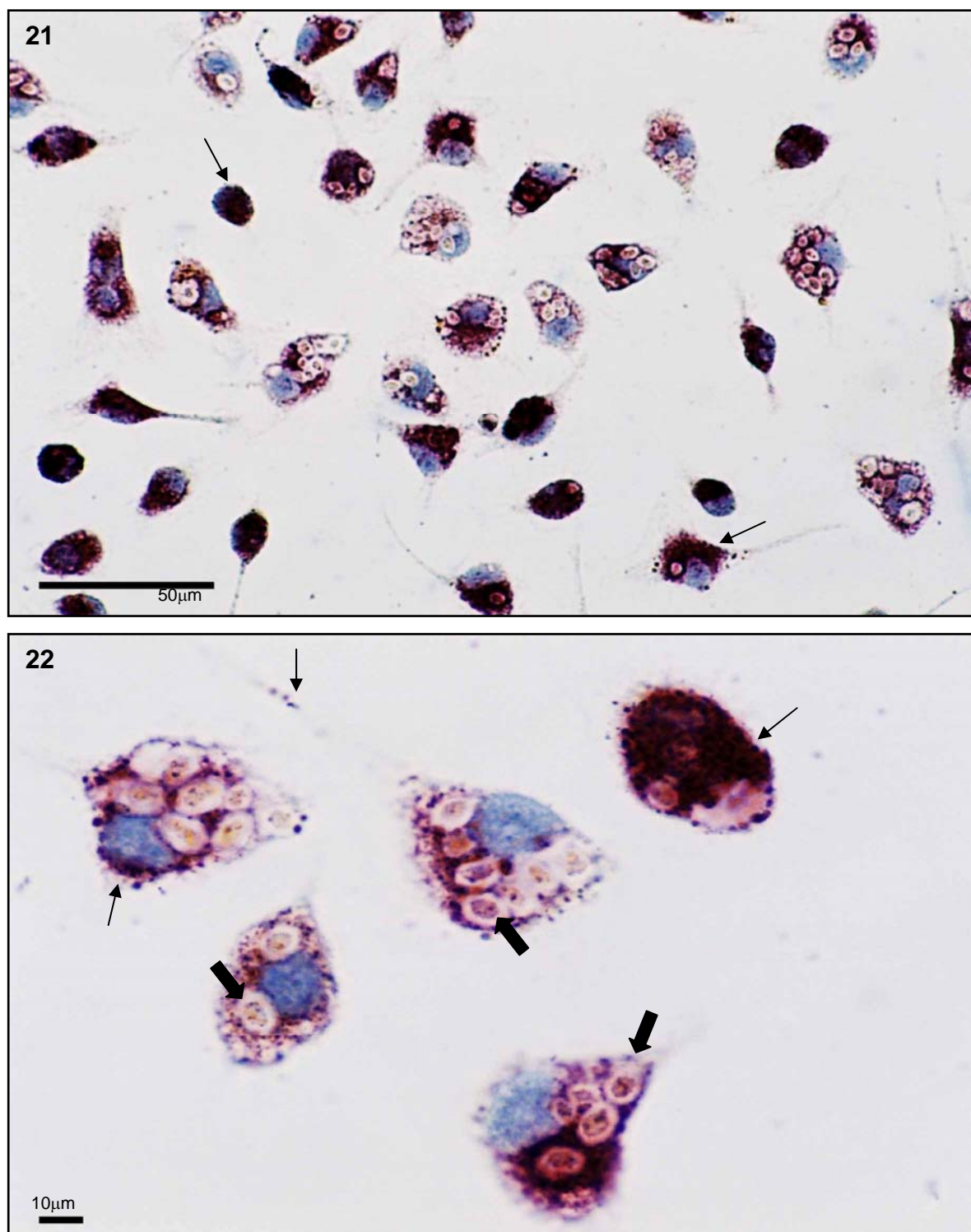




**FIGURAS 19 e 20: AcPase - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.**

Macrófagos peritoneais de camundongos após fagocitose de leveduras, células contendo marcação específica para a enzima AcPase.

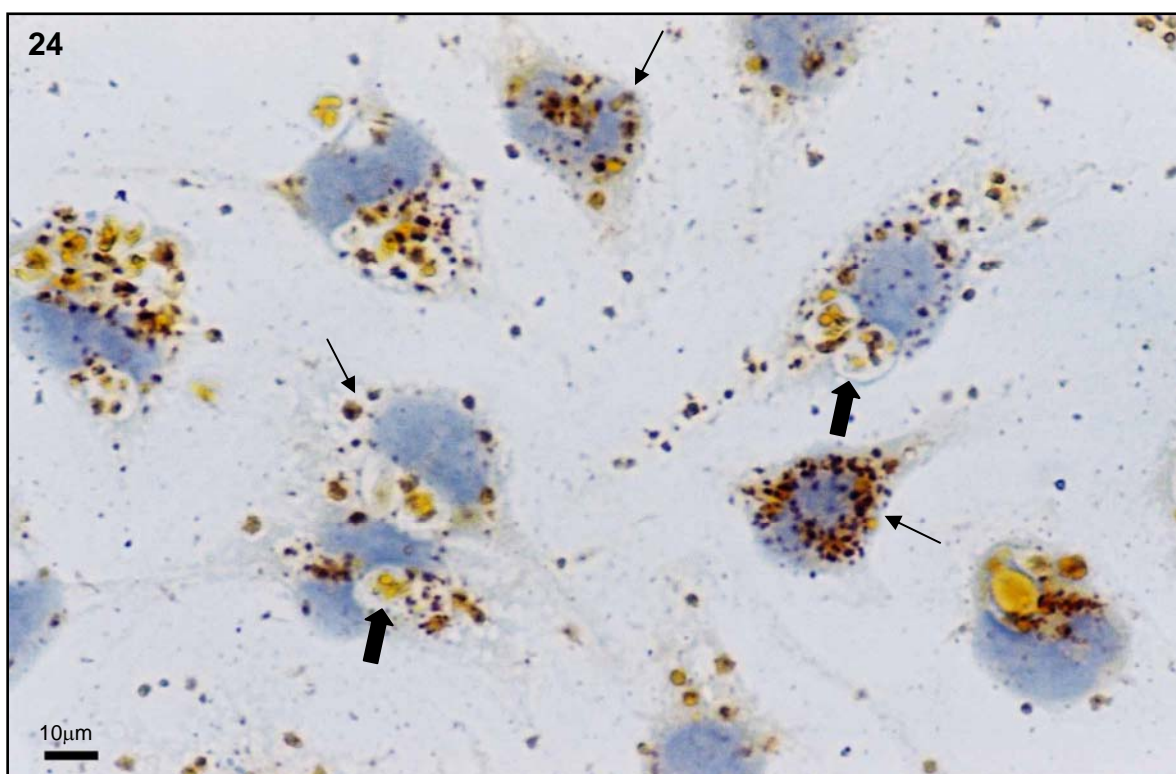
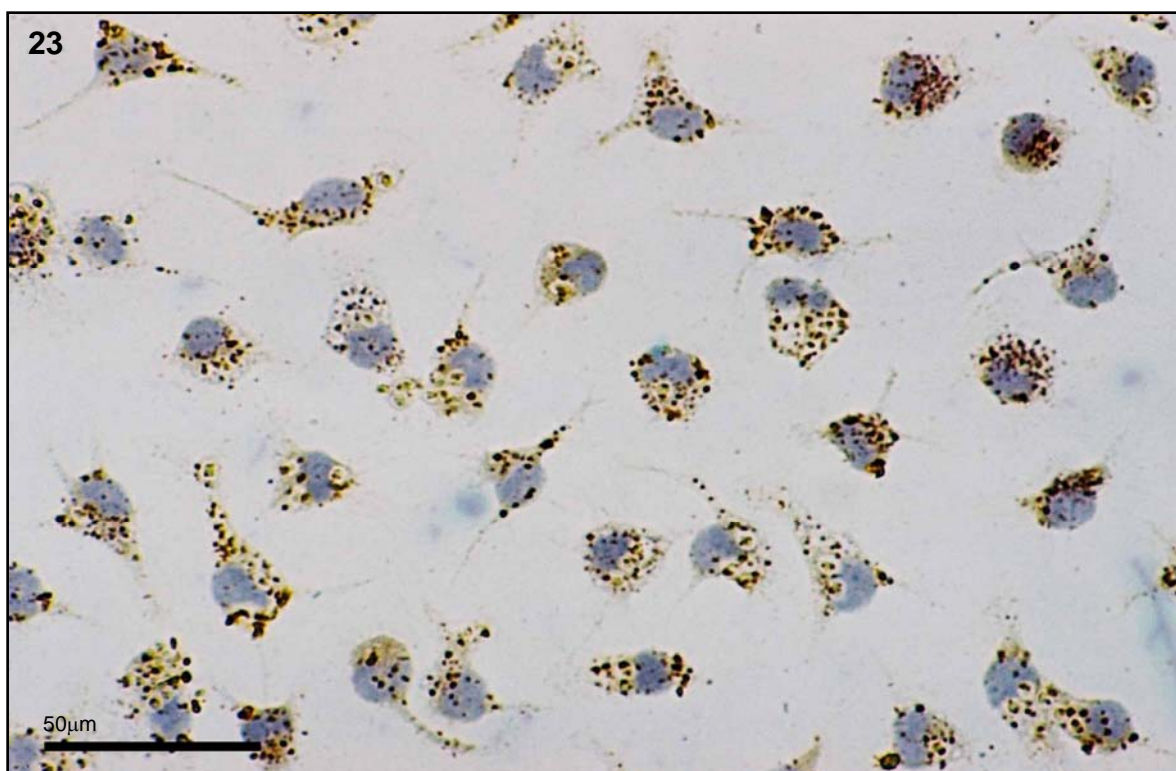
Seta estreita: marcação de cor roxa, distribuída pelo citoplasma, inclusive em projeções citoplasmáticas. Seta larga: leveduras fagocitadas.



**FIGURAS 21 e 22: AcPase - grupo tratado com Canova - tratamento *in vitro*.**

Macrófagos peritoneais de camundongos contendo maior número de leveduras fagocitadas e marcação específica mais intensa para a enzima, se comparada com o grupo controle.

Seta estreita: marcação de cor roxa, distribuída pelo citoplasma, inclusive em projeções citoplasmáticas. Seta larga: leveduras fagocitadas.

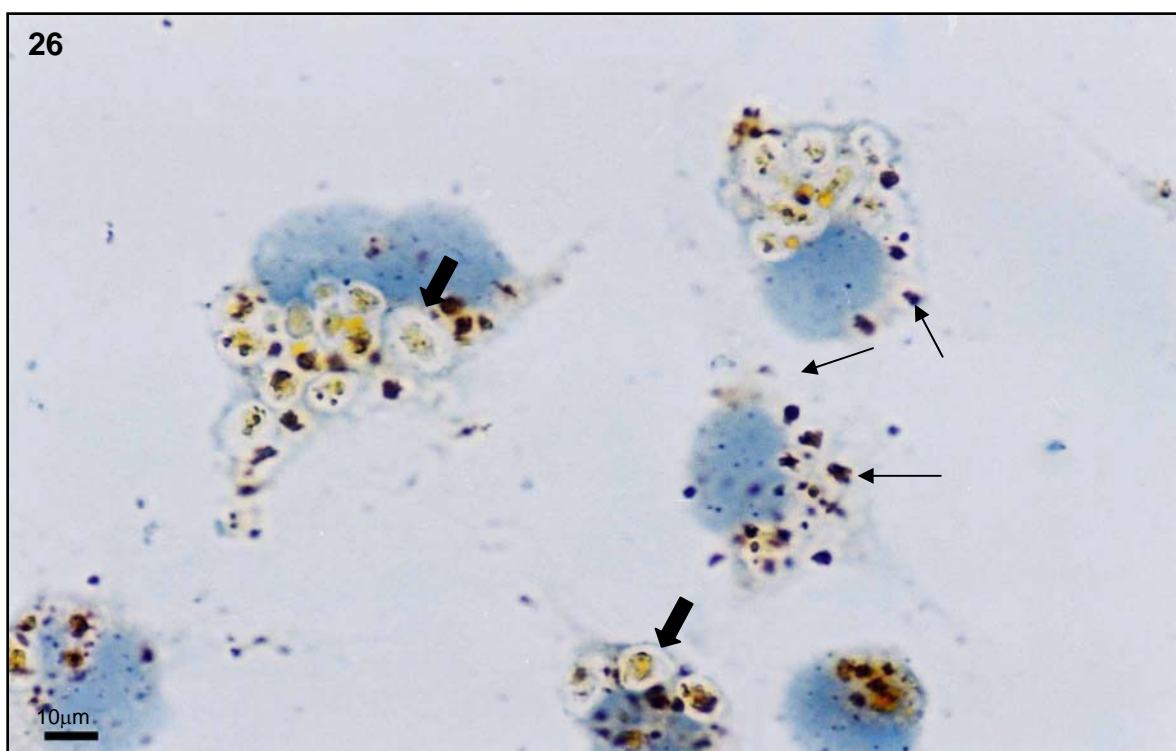
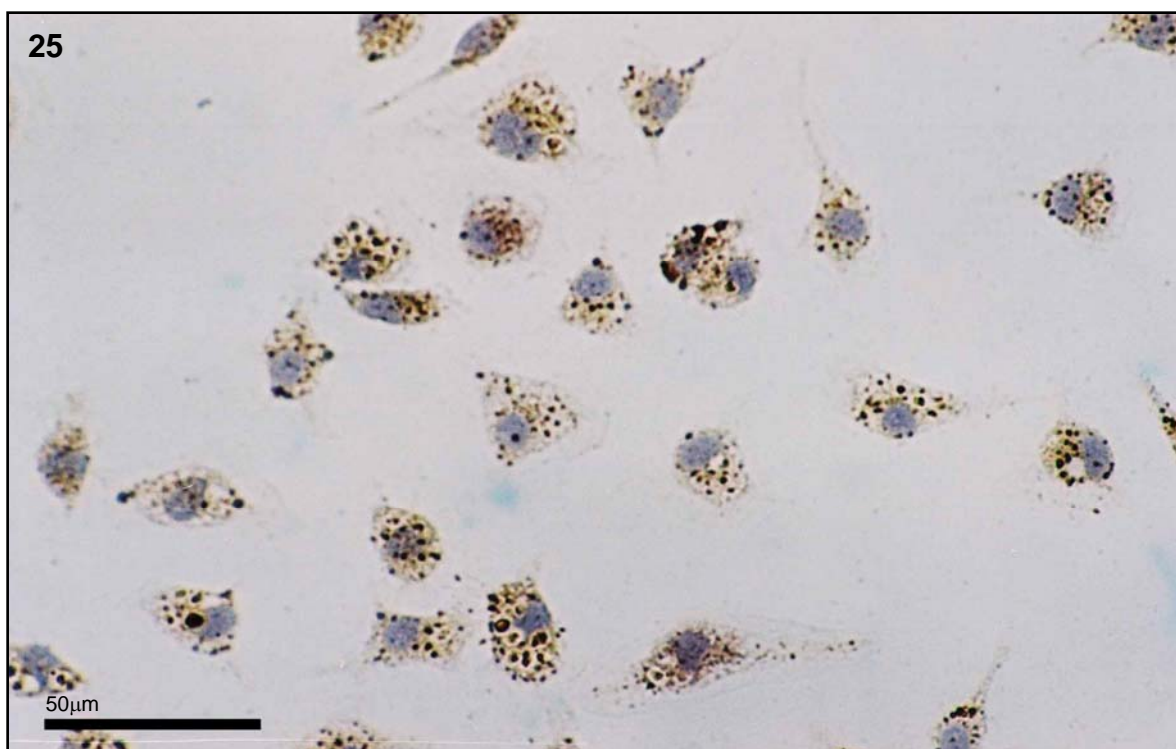


**FIGURAS 23 e 24: TRAP - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.**

Macrófagos peritoneais de camundongos após 2 horas de interação com leveduras. Células contendo intensa marcação específica para a enzima TRAP.

Seta estreita: marcação de cor marrom, distribuída no citoplasma. Seta larga: levedura fagocitada.





**FIGURAS 25 e 26: TRAP - grupo tratado com Canova - tratamento *in vitro*.**

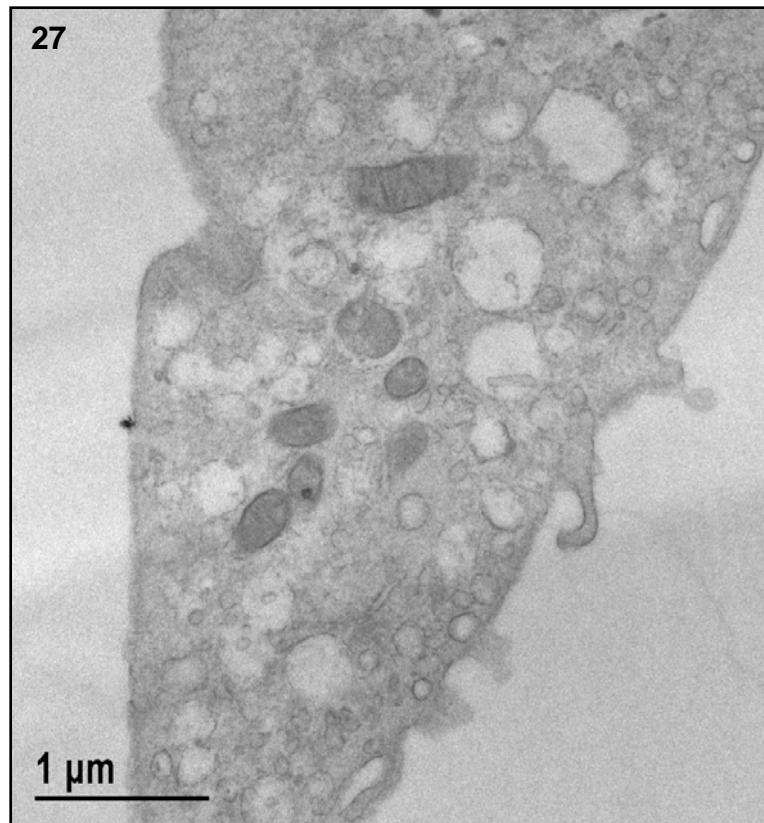
Macrófagos peritoneais de camundongos, após 2 horas de interação com leveduras. As células fagocitaram muitas leveduras, as quais também mostraram reação positiva específica para a enzima TRAP.

Seta estreita: marcação de cor marrom dispersa por todo o citoplasma. Seta larga: levedura fagocitada.

## 5.2 $Mg^{++}$ ATPase - CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL

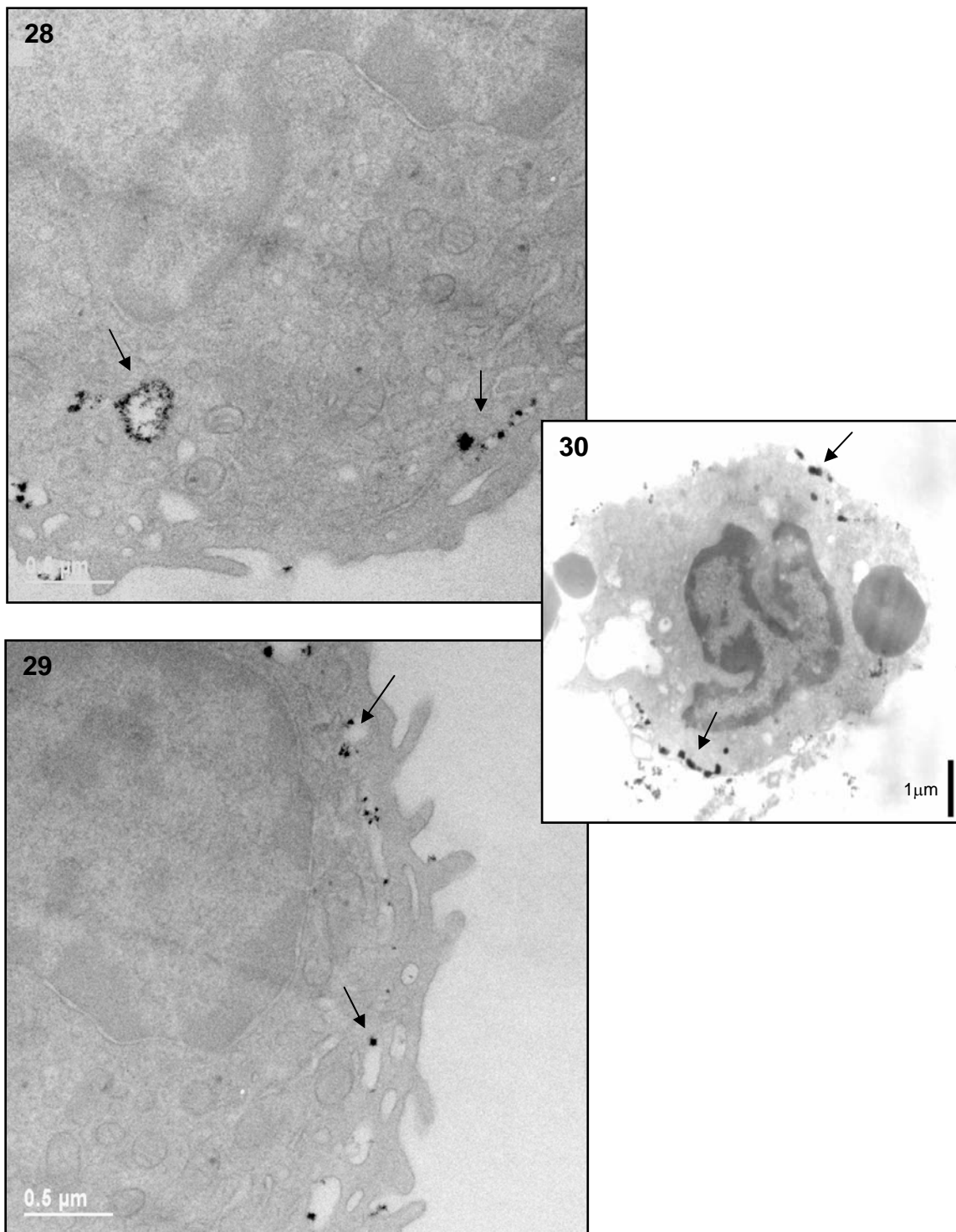
Nos experimentos em que as células foram tratadas *in vitro*, os resultados mostraram-se semelhantes a experimentos onde foi feito o tratamento *in vivo* dos animais. Os macrófagos apresentaram reação citoquímica positiva para a enzima  $Mg^{++}$ ATPase, tanto no grupo tratado com Canova como no grupo controle do tratamento. A especificidade da reação foi comprovada com o controle da enzima (figura 27) que não recebeu o substrato da enzima (ATP), portanto não se formou precipitado eletrondenso de fosfato de Cério. Fraca marcação eletrondensa em vesículas do sistema endossoma/lisossoma foi observada no grupo controle do tratamento (figuras 28, 29 e 30). Marcação eletrondensa mais intensa foi verificada no grupo tratado com Canova (figuras 31, 32 e 33), a marcação é muito evidente no lúmen de vesículas e túbulos do sistema endossoma/lisossoma.





**FIGURA 27:  $Mg^{++}$ ATPase – grupo controle da enzima.**

Macrófago peritoneal de camundongo na ausência do substrato da enzima. Não foi observada marcação eletrondensa para este grupo de células processadas como grupo controle da reação da enzima  $Mg^{++}$ ATPase.



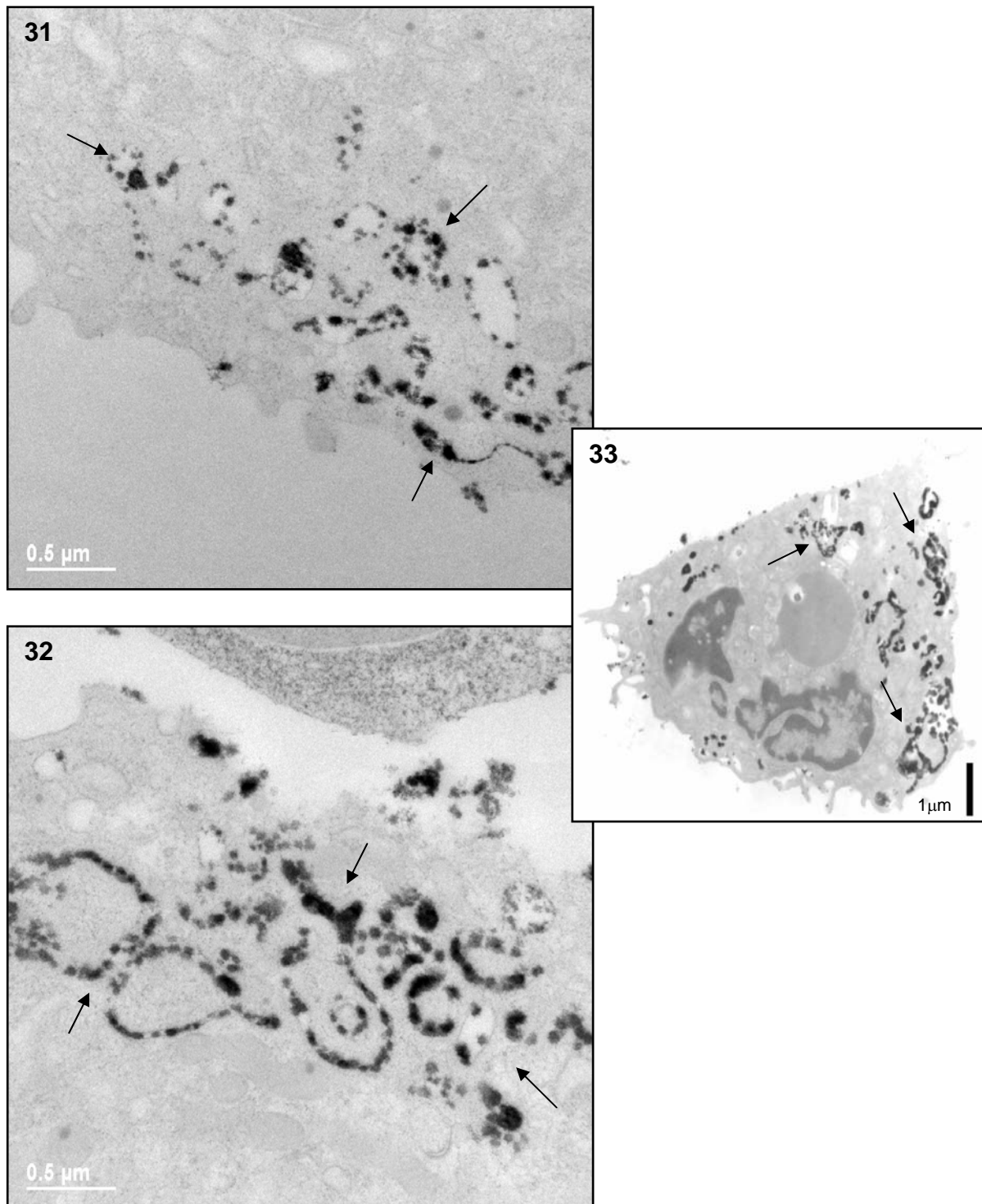
**FIGURAS 28 e 29: Mg<sup>++</sup>ATPase - grupo controle do tratamento - *in vivo*.**

Macrófagos peritoneais de camundongos com poucas vesículas, contendo pouca marcação eletrodensa em seu interior.

**FIGURA 30: Mg<sup>++</sup>ATPase - grupo controle do tratamento - *in vitro*.**

Resultado semelhante ao tratamento *in vivo*.

Setas: marcação eletrodensa fraca, mostrando reação para a enzima Mg<sup>++</sup>ATPase.



**FIGURAS 31 e 32:  $Mg^{++}ATPase$  - grupo tratado com Canova - *in vivo*.**

Macrófagos peritoneais, com aspecto de ativados, mostrando muitas vesículas e túbulos do sistema endossoma/lisossoma intensamente marcados.

**FIGURA 33:  $Mg^{++}ATPase$  - grupo tratado com Canova - *in vitro*.**

Resultado semelhante ao tratamento *in vivo*.

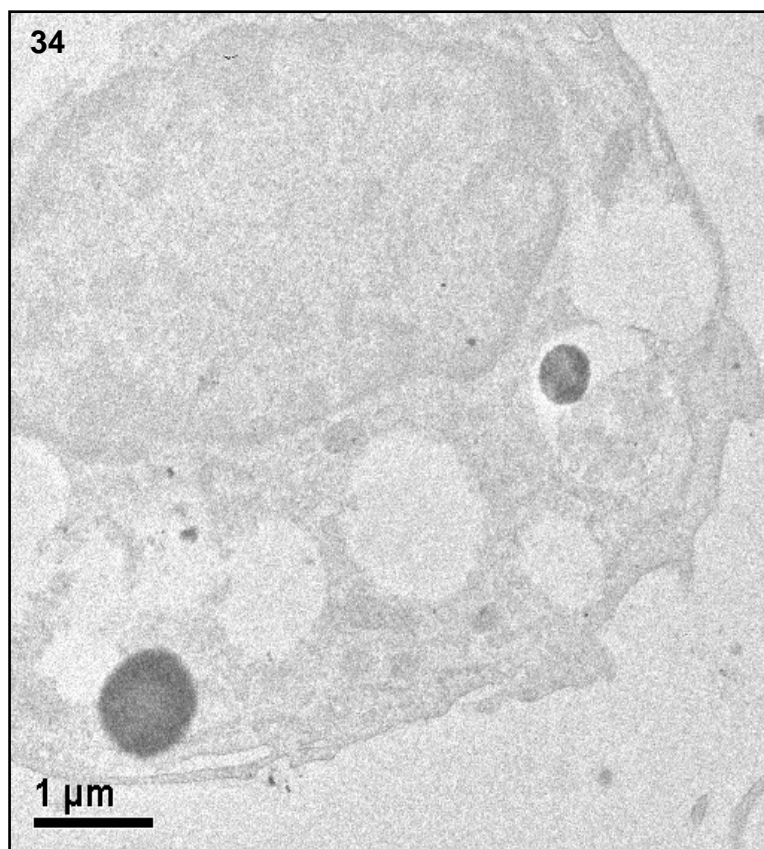
Setas: intensa marcação eletrondensa para a enzima  $Mg^{++}ATPase$ .

### 5.3 CORPOS LIPÍDICOS

#### 5.3.1 CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL

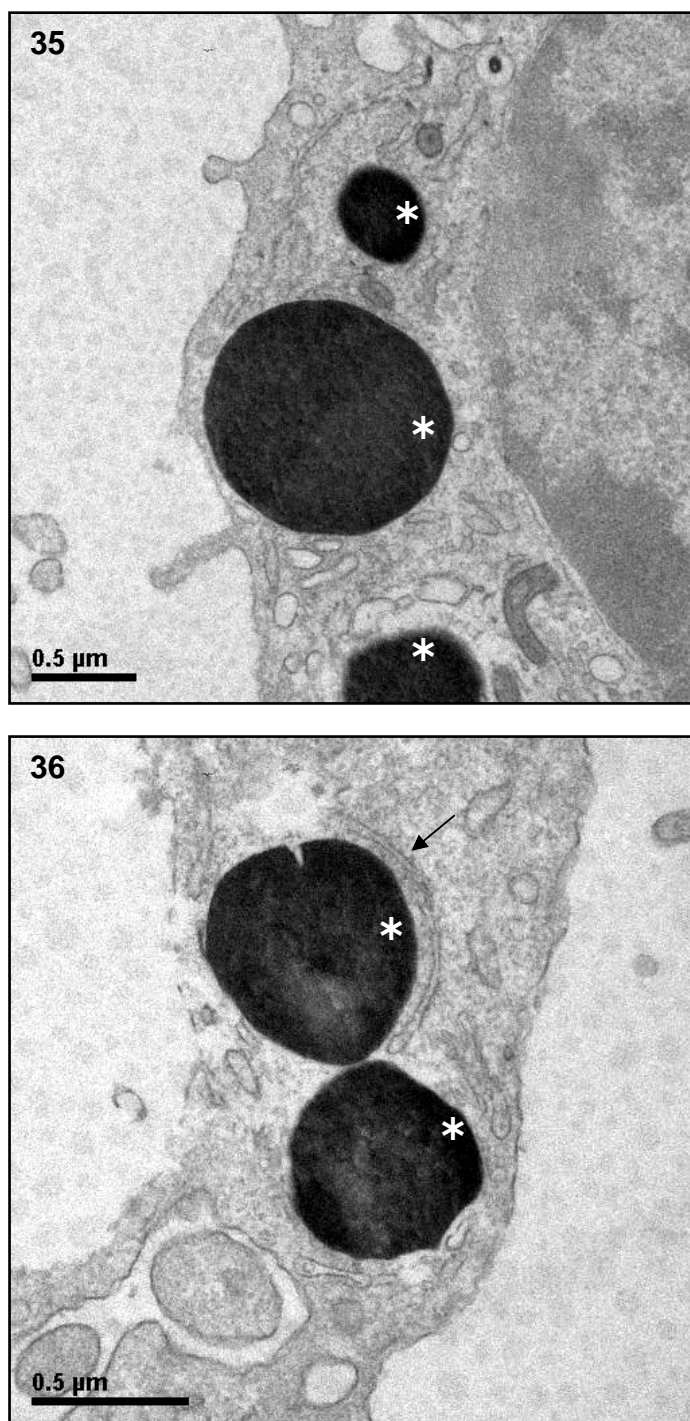
Nos macrófagos tanto do grupo tratado *in vitro* com Canova como no grupo controle do tratamento, observam-se os corpos lipídicos evidenciados por forte marcação eletrondensa, quando se utilizou o método ósmio-imidazol. Não foram observadas diferenças entre os grupos tratado e controle. Os corpos lipídicos localizam-se principalmente próximos a vacúolos (figuras 36, 37 e 39), estando muitas vezes no interior dos mesmos (figuras 38, 42 e 43). São encontrados também dispersos pelo citoplasma, principalmente na periferia celular (figura 35) com vesículas, retículo endoplasmático e mitocôndrias ao redor (figuras 36, 40 e 41).

Na interação dos macrófagos com leveduras por 2 horas, também não foram detectadas diferenças em relação aos corpos lipídicos entre os grupos tratado e controle. Observa-se a forte marcação eletrondensa, tanto nos macrófagos (figuras 45 e 49) como nas leveduras (figuras 44 e 47). Os corpos lipídicos estão localizados geralmente ao redor dos vacúolos fagocíticos e também são encontradas imagens sugestivas de fusão dos corpos lipídicos com os vacúolos digestivos (figuras 46 e 49) ou em processo de digestão mais avançado juntamente com as leveduras (figuras 45 e 48).



**FIGURA 34: Método ósmio-imidazol - grupo controle da reação.**

Macrófago peritoneal de camundongo, células processadas sem imidazol.

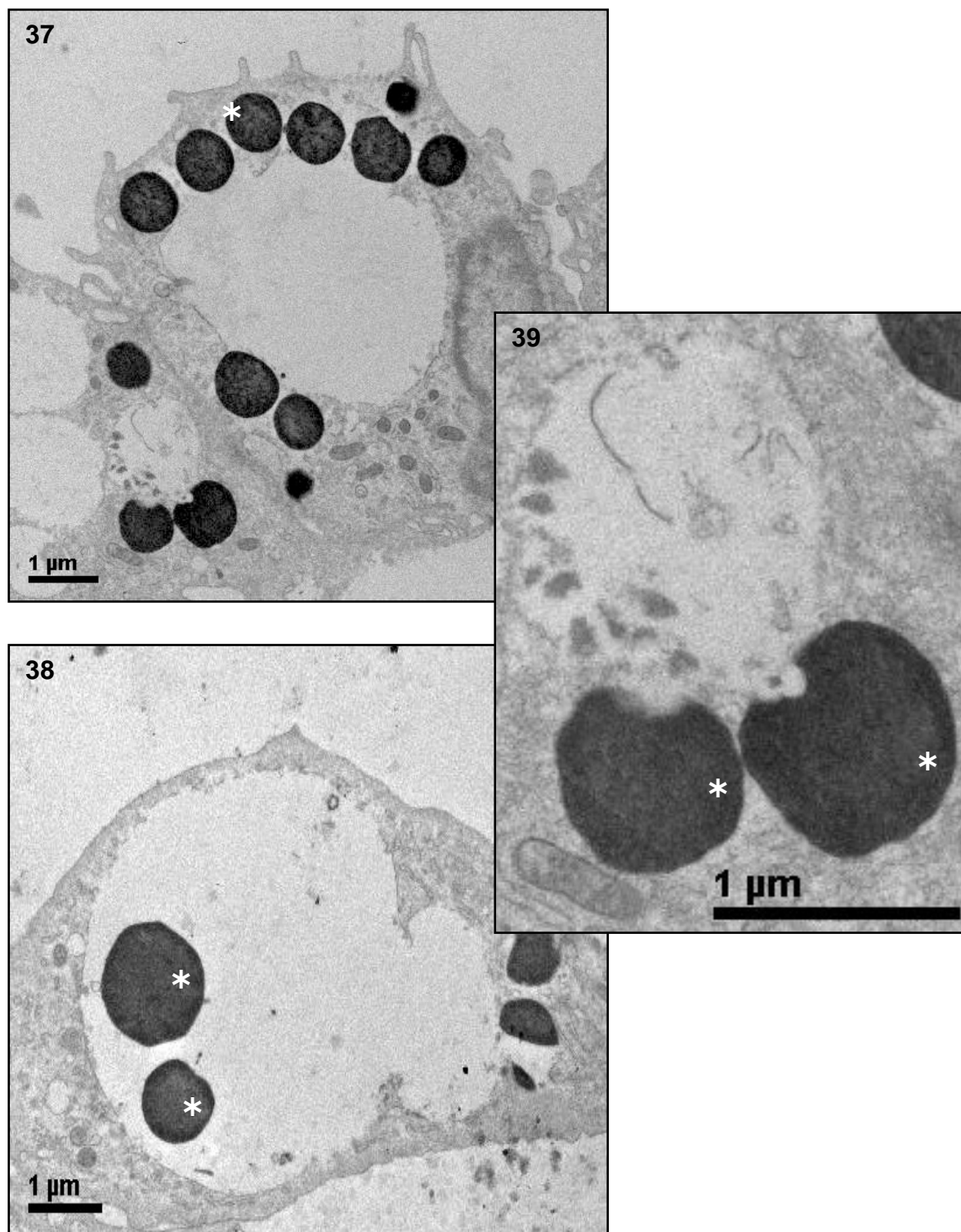


**FIGURAS 35 e 36: Método ósmio-imidazol - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.**

Corpos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos. Observa-se os corpos lipídicos evidenciados por forte marcação eletrondensa.

FIGURA 35 - corpos lipídicos (\*) na periferia celular;

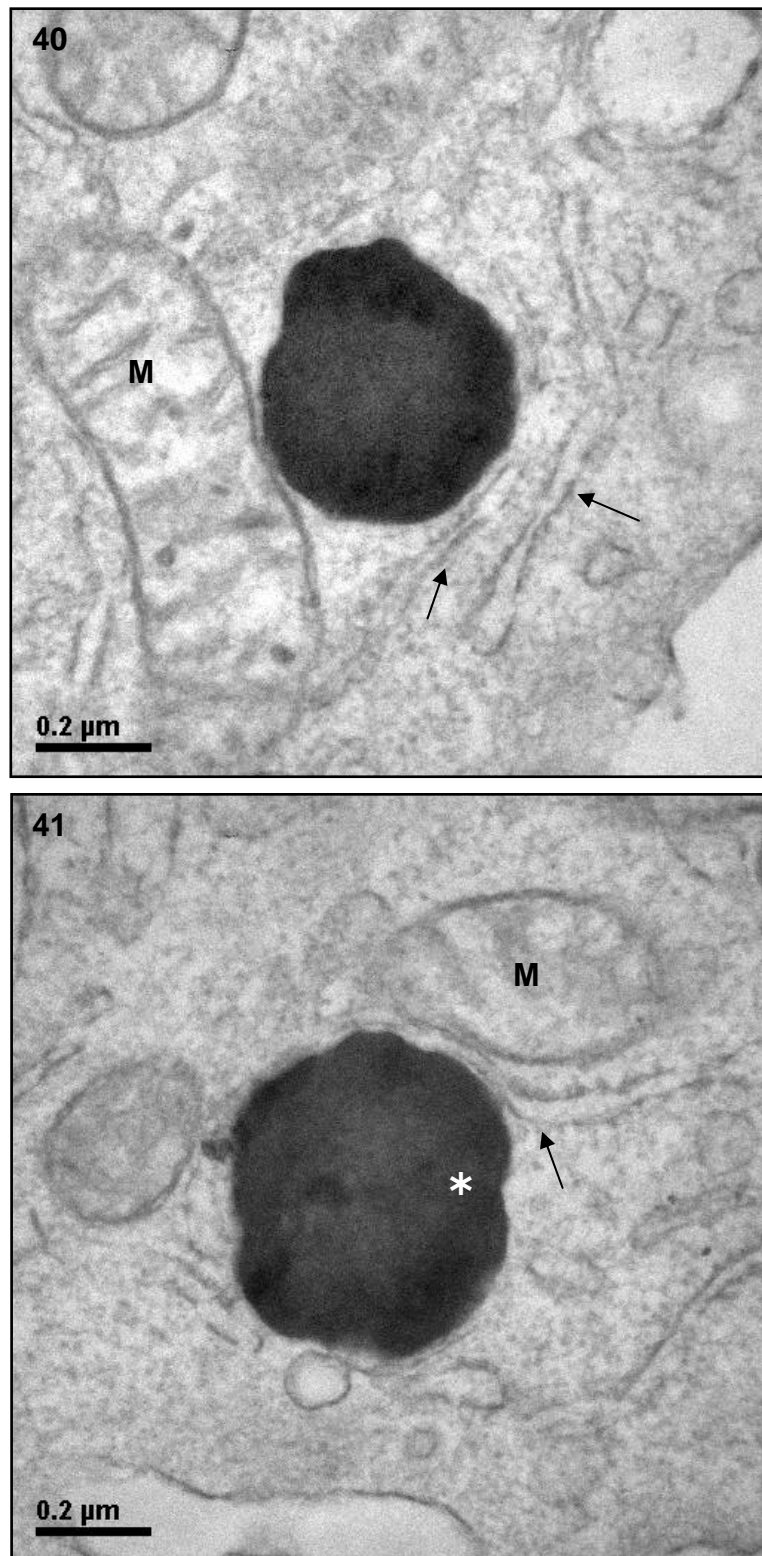
FIGURA 36 - corpos lipídicos muito próximos à vacúolos, com muitas vesículas e retículos (seta) ao redor.



**FIGURAS 37, 38 e 39: Método ósmio-imidazol - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.**

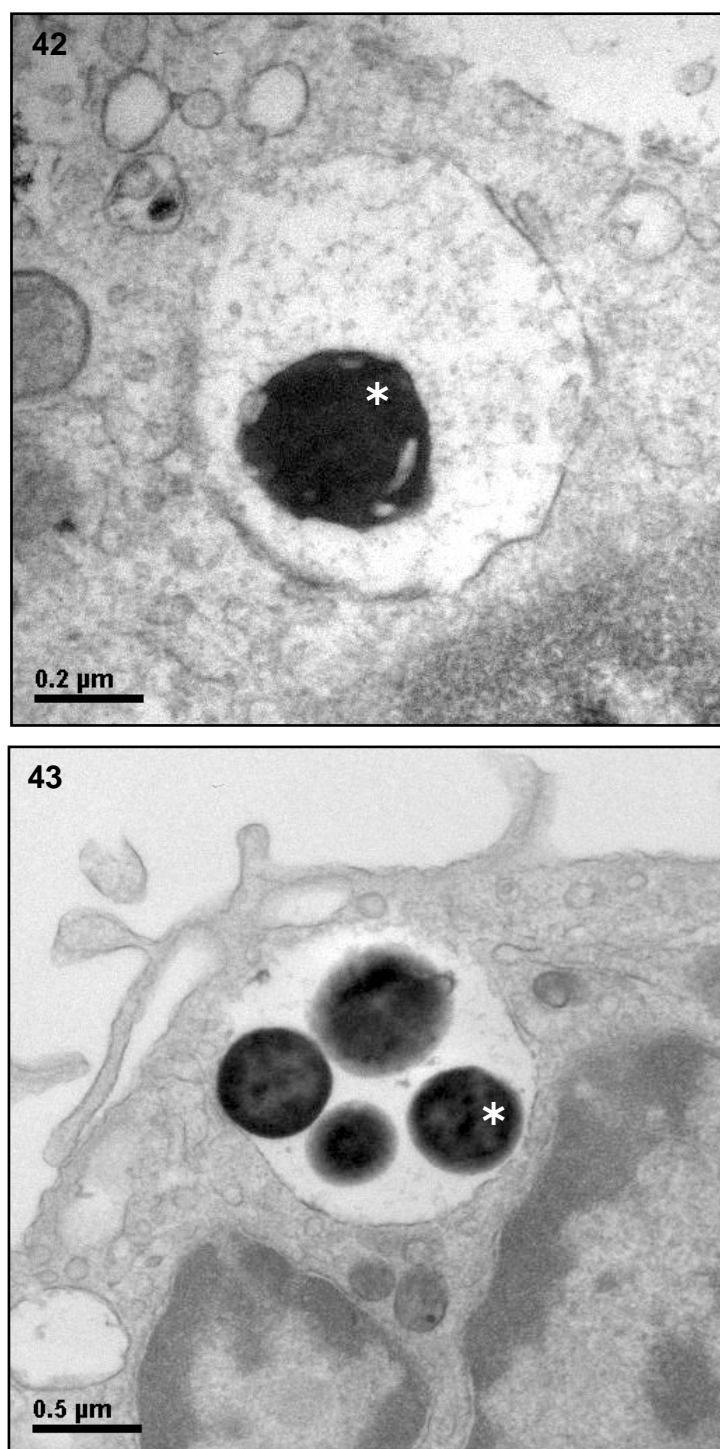
Observa-se grande número de corpos lipídicos evidenciados por forte marcação eletrondensa. Os corpos lipídicos (\*) estão localizados em regiões muito próximas ou até mesmo no interior dos vacúolos (detalhe sugestivo de digestão parcial na figura 39).



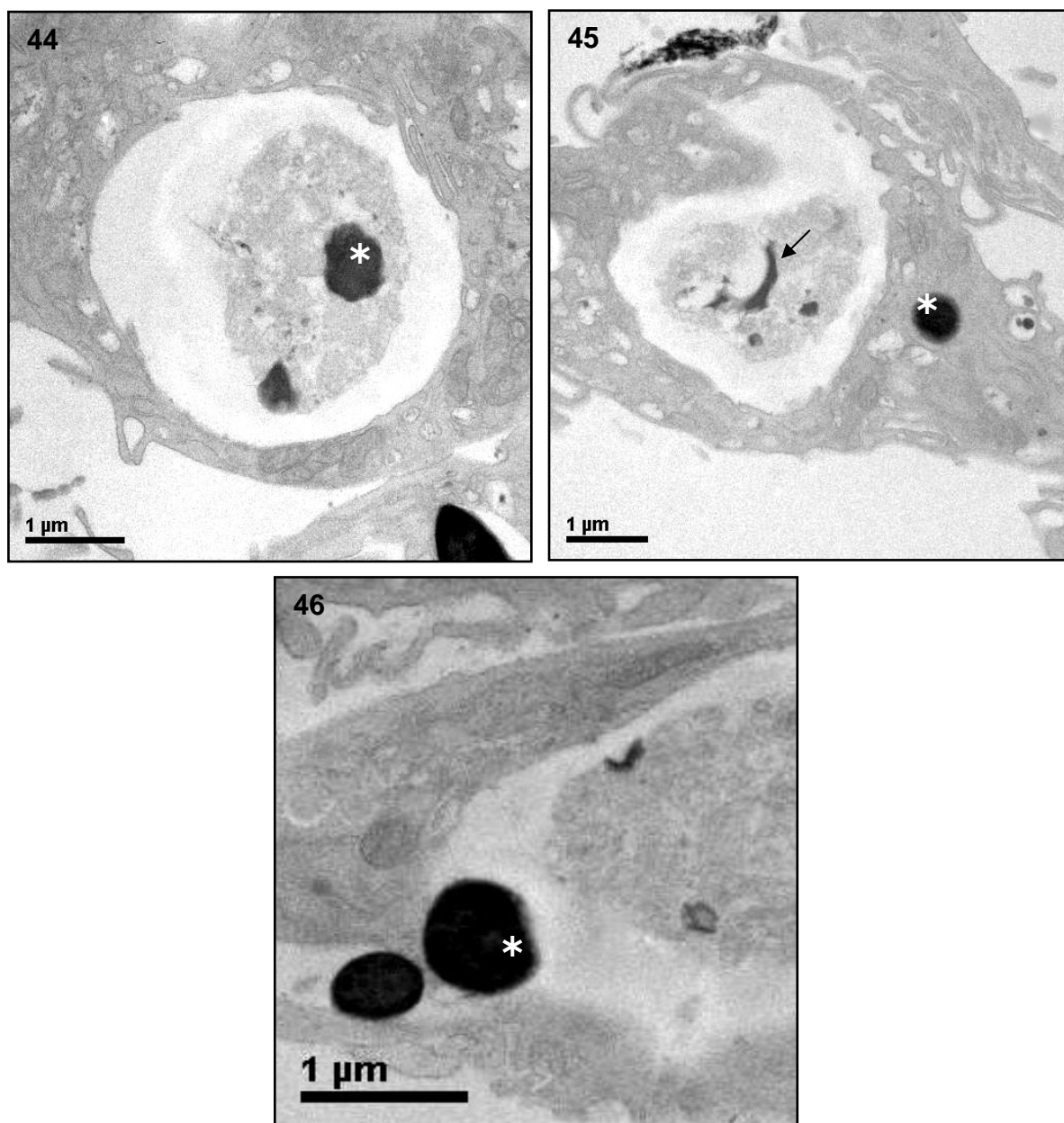


**FIGURAS 40 e 41: Método ósmio-imidazol - grupo tratado com Canova - experimento *in vitro*.** Macrófagos peritoneais de camundongos, **nos quais** observa-se corpos lipídicos (\*) evidenciados por forte marcação eletrondensa. Corpos lipídicos próximos à mitocôndrias (M), vesículas e retículos ao redor (seta).





**FIGURAS 42 e 43: Método ósmio-imidazol - grupo tratado com Canova - experimento *in vitro*.**  
Pode-se observar os corpos lipídicos (\*) eletrondensos no interior de vacúolos citoplasmáticos.



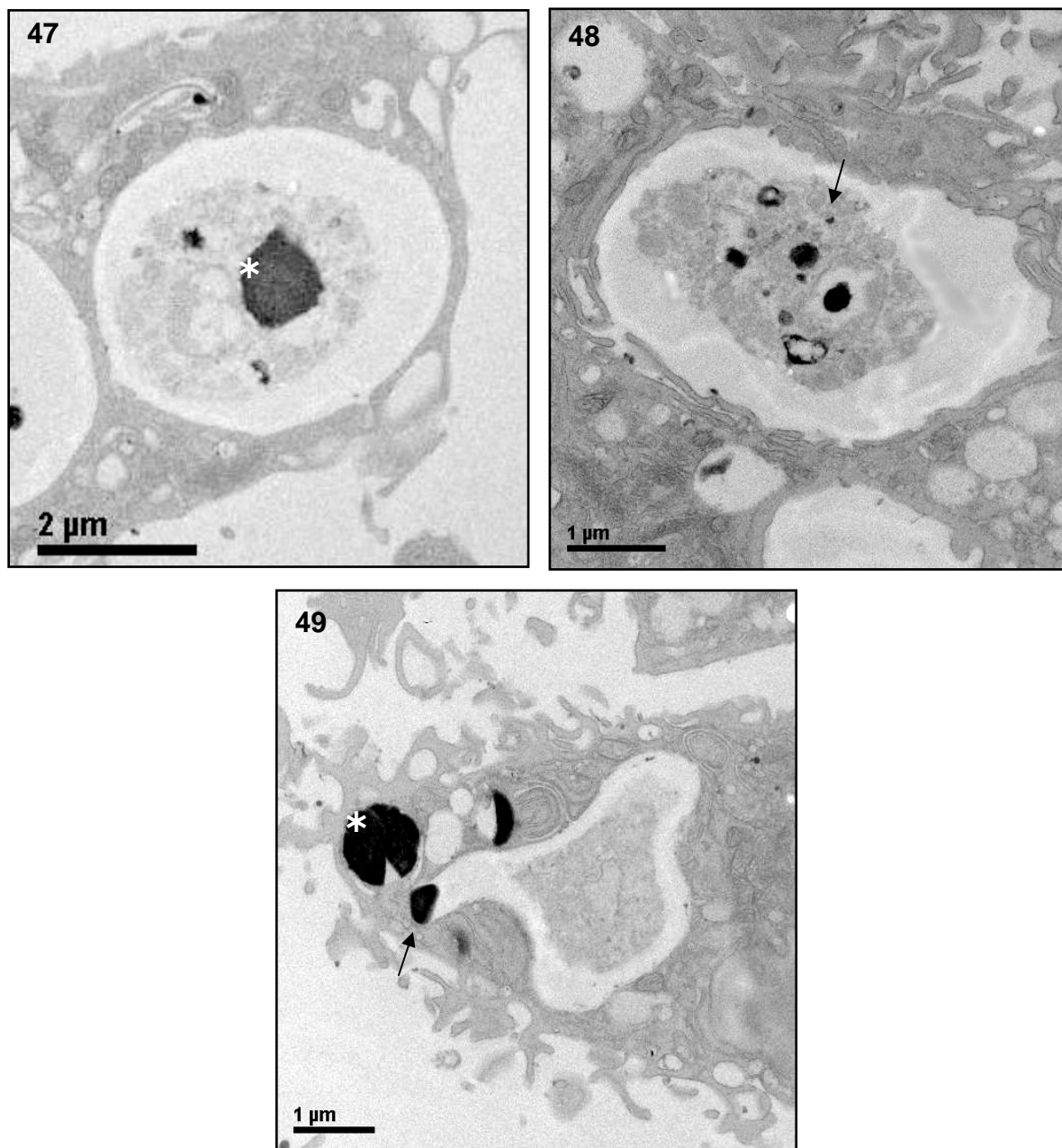
**FIGURAS 44, 45 e 46: Método ósmio-imidazol - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.**

Corpos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos após fagocitose de leveduras. Observam-se corpos lipídicos (\*), evidenciados por forte marcação eletrondensa.

FIGURA 44 - corpos lipídicos na levedura;

FIGURA 45 - lipídios em processo de digestão mais avançado juntamente com a levedura (seta);

FIGURA 46 - Imagem sugestiva de fusão do corpo lipídico com o fagossomo.



**FIGURAS 47, 48 e 49: Método ósmio-imidazol - grupo tratado com Canova - experimento *in vitro*.**

Corpos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos após fagocitose de leveduras. Corpos lipídicos (\*), evidenciados por forte marcação eletrondensa.

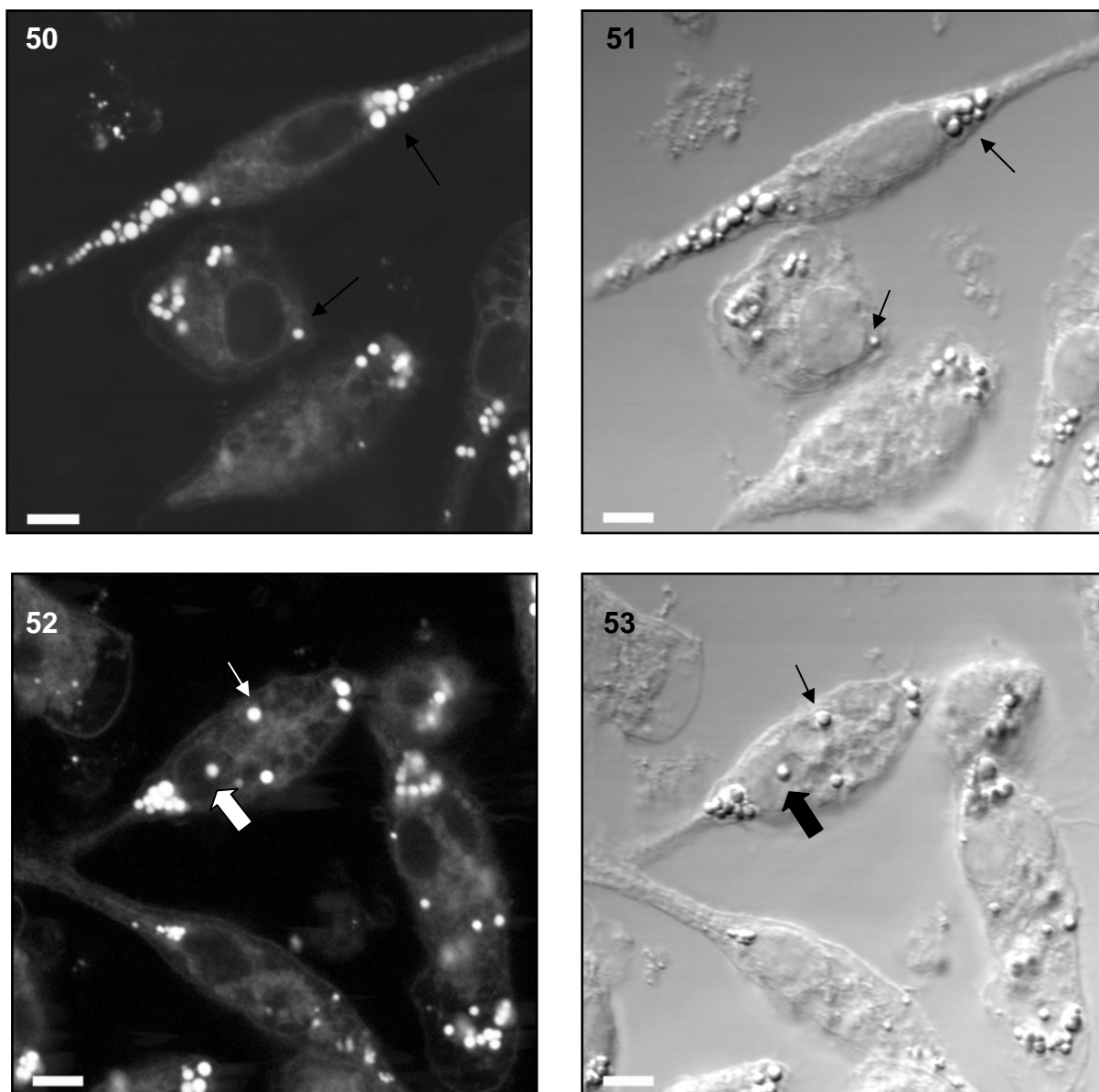
FIGURA 47 - corpos lipídicos na levedura;

FIGURA 48 - lipídios em processo de digestão mais avançado juntamente com levedura;

FIGURA 49 - imagem que sugere a fusão do corpo lipídico, já parcialmente digerido, com o fagossoma (seta).

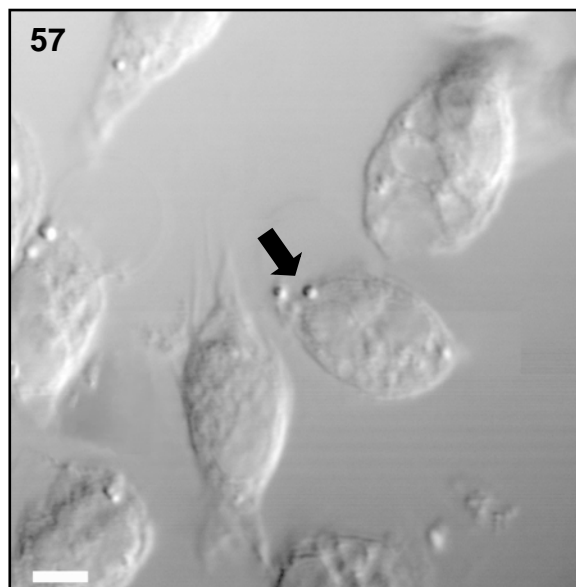
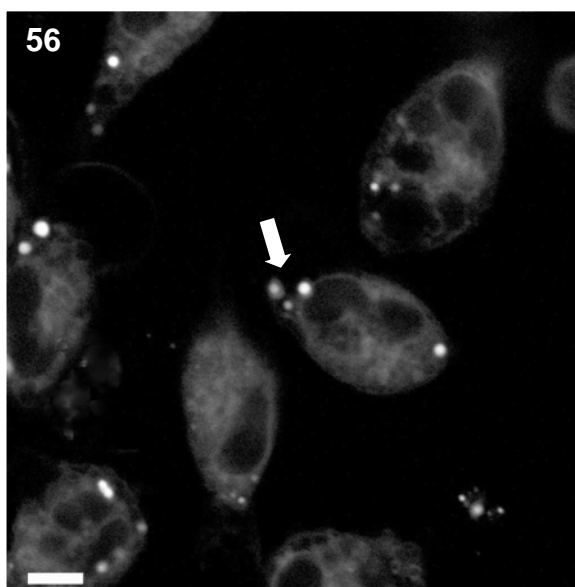
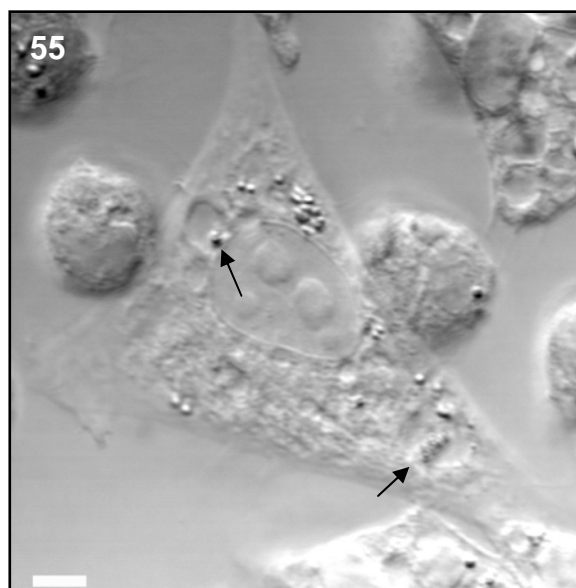
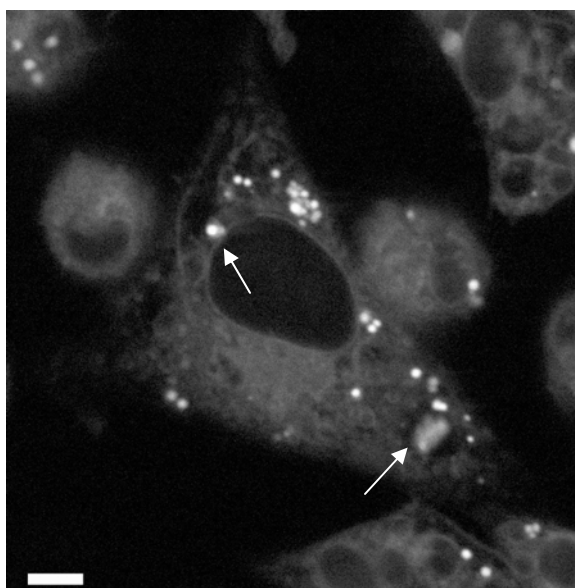
### 5.3.2 MICROSCOPIA CONFOCAL

Os corpos lipídicos dos macrófagos, evidenciados pela marcação com o corante Vermelho Nilo, estão distribuídos por todo o citoplasma, sendo encontrados também no interior de vacúolos. No grupo controle (figuras 50, 51, 52 e 53) os corpos lipídicos são maiores e estão em maior quantidade que no grupo tratado com Canova (figuras 54, 55, 56 e 57). Na interação macrófago-levedura nota-se um menor número de corpos lipídicos que nos macrófagos sem leveduras, tanto no grupo tratado, como no grupo controle do tratamento. Como nos outros experimentos, observa-se uma capacidade maior de fagocitose dos macrófagos do grupo tratado (figuras 60 e 61), quando comparados com o controle (figuras 58 e 59).



**FIGURAS 50 e 52: Vermelho Nilo - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.** Microscopia confocal de macrófagos peritoneais de camundongos. Seta estreita: corpos lipídicos dispersos pelo citoplasma. Seta larga: Corpos lipídicos no interior de vacúolos. Barra 5μm.

**FIGURAS 51 e 53: Vermelho Nilo - grupo controle do tratamento - experimento *in vitro*.** Microscopia de contraste de interferência diferencial. Imagens equivalentes às imagens de microscopia confocal. Barra 5μm.



**FIGURAS 54 e 56: Vermelho Nilo - grupo tratado com Canova - tratamento *in vitro*.**

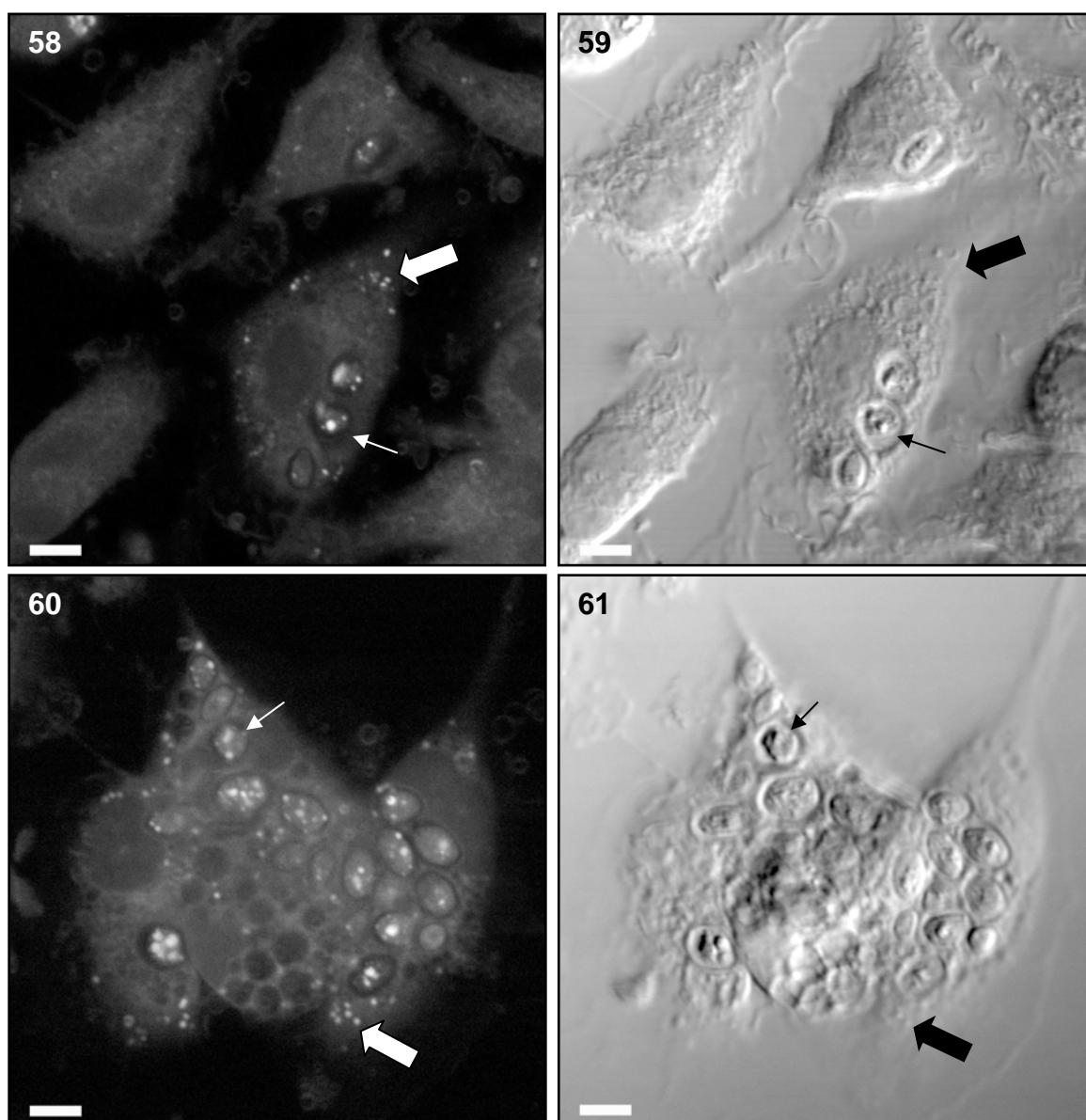
Microscopia confocal de macrófagos peritoneais de camundongos corados com Vermelho Nilo.

Seta estreita: corpos lipídicos no interior de vacúolos; Seta: Corpos lipídicos dispersos pelo citoplasma. Barra 5 $\mu$ m.

**FIGURAS 55 e 57: Vermelho Nilo - grupo tratado com Canova - tratamento *in vitro*.**

Microscopia de contraste de interferência diferencial. Imagens equivalentes às imagens de microscopia confocal.

Seta: corpos lipídicos no interior de vacúolos. Barra 5 $\mu$ m.



**FIGURA 58: Vermelho Nilo - grupo controle do tratamento - tratamento *in vitro*.**

Microscopia confocal de macrófagos após interação com leveduras. Células com alguns corpos lipídicos corados, dispersos pelo citoplasma (seta larga). Observa-se no interior dos macrófagos algumas leveduras contendo corpos lipídicos (seta estreita), em vacúolos fagocíticos. Barra 5 $\mu$ m.

**FIGURA 60: Vermelho Nilo - grupo tratado com Canova - tratamento *in vitro*.**

Microscopia confocal de macrófago após duas horas de interação com leveduras, com alguns corpos lipídicos dispersos pelo citoplasma (seta larga). Observa-se no interior do macrófago inúmeras leveduras contendo corpos lipídicos (seta estreita), em vacúolos fagocíticos. Barra 5 $\mu$ m.

**FIGURAS 59 e 61: Vermelho Nilo - tratamento *in vitro* - microscopia de contraste de interferência diferencial.** Imagens equivalentes às imagens de microscopia confocal.

## 6. DISCUSSÃO

Quando patógenos, células apoptóticas ou moléculas específicas se ligam a receptores da membrana plasmática de macrófagos, profundas modificações acontecem e esta célula passa a estar em um estado denominado ativado. Os critérios bioquímicos e morfológicos que caracterizam o estado de ativação dos macrófagos foram descritos em 1978 (COHN, 1978; KARNOVSKY, LAZDINS, 1978). Algumas destas características relatadas puderam ser observadas no presente trabalho como aumento de volume citoplasmático, maior espriamento, capacidade fagocítica aumentada, maior número de vesículas citoplasmáticas, aumento de atividades ATPase e maior atividade de hidrolases lisossomais. A ativação de macrófagos peritoneais de camundongos através do tratamento com Canova já havia sido descrita através de análises morfológicas e moleculares em microscopia de luz, confocal e eletrônica de varredura. Piemonte e Buchi encontraram em cultivo celular de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com Canova uma ativação de 86%, contra 15% de ativação nos grupos controle; já em cultivo celular tratado *in vitro* com meio de cultura, contendo 10% de Canova, foi encontrado 72% de ativação no grupo tratado contra 33% de ativação no grupo controle (PIEMONTE, BUCHI, 2002).

No presente trabalho a ativação dos macrófagos tratados com Canova foi corroborada com critérios citoquímicos, através do aumento na atividade das enzimas  $Mg^{++}$ ATPase e fosfatase ácida.

Endossomas precoce, endossomas tardio e lisossomas compreendem um universo de compartimentos que não podem ser identificados com base somente na sua morfologia. Faz exceção os corpos multivesiculares que apresentam característico sistema de membranas intravesiculares (GRUENBERG, 2003). Portanto, o uso de uma enzima hidrolítica característica do sistema digestivo intracelular é de grande valia para a identificação destas organelas. A fosfatase ácida durante muitos anos foi utilizada como marcadora de lisossomas (OLEA, 1991; ROBINSON, KARNOVSKY, 1983). Atualmente já está bem estabelecido que as vesículas transportadoras contendo enzimas hidrolíticas destinadas aos lisossomas são oriundas do Complexo de Golgi e fundem-se com endossoma precoce. As enzimas são então transferidas ao longo da via endocítica até os lisossomas



(GRUENBERG, 2003). Logo, a fosfatase ácida é uma enzima que está presente em endossomas e lisossomas (LUO, ROBINSON, 1992), sendo um bom parâmetro citoquímico para avaliar modificações nestes sistemas.

O conjunto das vesículas marcadas citoquimicamente para fosfatase ácida corresponde ao sistema endossoma/lisossoma, uma vez que a morfologia heterogênea das vesículas e túbulos marcados está de acordo com o conhecimento atual sobre essas organelas (GRUENBERG, 2003). A atividade e a distribuição da fosfatase ácida mostraram-se alteradas com a administração de Canova. Dois aspectos ficam evidentes: o aumento do número de compartimentos marcados e o aumento da deposição do produto de reação nestes compartimentos. A marcação com fosfatase ácida além de caracterizar grupo de organelas também indica os níveis de atividade da própria enzima. O aumento do sistema endossomal e da atividade fosfatase ácida no macrófago ativado é evidente, considerando a sua função no papel do macrófago. Estas células formam extensões da membrana plasmática, internalizam patógenos e células apoptóticas, dentre outros, originando um novo compartimento, o fagossoma. Após a sua formação, o fagossoma sofre um complexo e ordenado processo de amadurecimento, fundindo-se com endossomas e lisossomas, adquirindo diferentes proteínas e enzimas lisossomais (GARIN et al., 2004). O compartimento resultante, com grande atividade digestiva e de destruição, é denominado fagolisossoma (UNDERHILL, OZINSKY, 2002; GARIN et al., 2004). Fica evidente, portanto, que o aumento do sistema endossoma/lisossoma, bem como de suas enzimas, é condição para a destruição de patógenos eventualmente englobados. O aumento da fosfatase ácida e do número de endossomas/lisossomas indica que o macrófago, ativado por Canova, está com a sua maquinaria de destruição de patógenos pronta para entrar em ação através da fusão de endossomas e lisossomas com os eventuais fagossomas formados (UNDERHILL, OZINSKY, 2002; GARIN et al., 2004).

Godoy em 2002 foi descreveu o aumento de 37% no índice endocítico de leveduras nos macrófagos tratados com Canova (GODOY, 2002). Este resultado é corroborado em todos os experimentos realizados com leveduras, onde notamos um maior número de leveduras fagocitadas nos macrófagos tratados com Canova. Os nossos resultados de fagocitose de leveduras confirmam a ativação do sistema endossoma/lisossoma. Nas células com levedura, do grupo controle do tratamento,

já se observa um aumento das vesículas marcadas para fosfatase ácida, quando comparado com a célula controle de macrófagos que não fagocitaram levedura. Portanto receptores envolvidos na fagocitose de leveduras, na ausência de Canova, já induzem ativação do macrófago, e do sistema endossoma/lisossoma. Neste sentido, a fagocitose de leveduras pode ser encarada como um controle positivo dos experimentos realizados com fosfatase ácida e Canova. Quando se adicionou leveduras ao cultivo de macrófagos previamente tratados com Canova, observou-se que a deposição de vesículas marcadas foi tal que a marcação cobriu toda a célula, deixando-a com aspecto granuloso violáceo muito escuro. Estes resultados sugerem um somatório da ativação pela levedura e pelo Canova. Nas células que fagocitaram muitas leveduras ocorreu uma redução destas granulações no citoplasma e observou-se a coloração característica da fosfatase ácida no interior dos vacúolos com levedura. Estes resultados indicam a fusão das vesículas positivas para atividade da fosfatase ácida com fagossomas, o que está de acordo com o conceito de que endossomas/lisossomas fundem-se com fagossomas (GARIN et al., 2004). O conjunto destes resultados mostra que macrófagos em presença de patógenos e ativados por Canova fagocitam mais e, uma vez que tem o arsenal da destruição extremamente desenvolvido, terão maior poder de degradação das partículas fagocitadas. É importante lembrar que, além das enzimas hidrolíticas, outras proteínas estão presentes nos fagossomas e fagolisossomas. Por exemplo, a membrana dos fagossomas em macrófagos ativados apresenta o complexo NADPH oxidase, que produz espécies reativas de oxigênio, que participam na morte dos patógenos recém-internalizados (UNDERHILL, OZINSKY, 2002), e mostra-se igualmente aumentado em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com Canova (OLIVEIRA, 2002).

Na análise dos experimentos realizados com o "Sigma Diagnostics Acid Phosphatase Kit" para TRAP, os resultados mostraram que macrófagos ativados por Canova ou pelas leveduras apresentam modificações na deposição do produto de reação no interior das vesículas, formando grânulos mais escuros dentro dos vacúolos contendo as leveduras, porém com menos grânulos positivos por célula. Estes resultados demonstram que esta redistribuição é inerente a ação de ativação do macrófago, com uma diminuição de um segundo tipo de fosfatase ácida, a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), enzima cujas funções ainda não são

muito bem esclarecidas. No conjunto, os resultados mostram que a ativação do macrófago induz a redistribuição das vesículas contendo fosfatase ácida e com aparente diminuição da TRAP. A fagocitose de leveduras mantém o mesmo padrão de atividade das enzimas fosfatase ácida e TRAP. A TRAP é produzida em menor quantidade nos tratados, ao contrário da fosfatase ácida total que está em maior atividade neste grupo de células em atividade fagocítica.

As vesículas do sistema endossoma/lisossoma dos macrófagos, marcadas pela reação citoquímica para  $Mg^{++}$ ATPase, apresentam as mesmas características morfológicas e localização que vesículas com marcação citoquímica para fosfatase ácida. A marcação para fosfatase ácida ocorre em praticamente todo o sistema endossoma/lisossoma, enquanto que parte dos endossomas não estão marcados para  $Mg^{++}$ ATPase. Os resultados sugerem que parte dos endossomas marcados para fosfatase ácida também apresentem marcação para  $Mg^{++}$ ATPase, o que sugere diferenças funcionais entre esses compartimentos.

A  $Mg^{++}$ ATPase teve sua atividade identificada no lúmen de organelas do sistema endossoma/lisossoma dos macrófagos, sendo observada a marcação muito mais intensa com a administração de Canova. Essas organelas têm sua morfologia bastante heterogênea, contendo vesículas e túbulos conforme o descrito na literatura. Gruenberg descreveu endossomas precoces, corpos multivesiculares, endossomas tardios e lisossomas, como organelas que compõem um sistema heterogêneo de túbulos (~60  $\eta$ m de diâmetro) e vesículas de diferentes diâmetros, sendo que as maiores podem medir até ~300-400  $\eta$ m diâmetro), que estão em constante processos de brotamento e fusão (GRUENBERG, 2003). Em macrófagos, além das diferenças inerentes entre endossoma precoce, endossoma tardio, corpo multivesicular e lisossoma, nas células ativadas também se observa endossomas destinados à apresentação de antígenos (MURK, 2002; BOES, CUVILLIER, PLOEGH et al., 2004). A morfologia de vesículas e túbulos marcados pela reação  $Mg^{++}$ ATPase lembra fortemente estes endossomas MHCII, que frequentemente apresentam-se como longos túbulos (CHOW et al., 2002) que nas células dendríticas ativadas se estendem na periferia celular (KLEIJMEER et al., 2001).

A reação positiva intraluminal da atividade ATPásica marcada demonstra que o sítio de utilização do ATP está voltado para dentro da vesícula (ESKELINEN, TANAKA, SAFTIG, 2002). A marcação citoquímica para  $Mg^{++}$ ATPase observada nos

macrófagos pode estar identificando locais de atividade de proteínas hsc73, já que estas são dependentes de atividades  $Mg^{++}$ ATPase e sua localização coincide com a descrita na literatura. Estudos em lisossomos de fígado de rato demonstraram em microscopia eletrônica que a ly-hsp73 é encontrada na maioria dos lisossomas, 25% ligado a membrana e 75% no lúmen lisossomal (CUERVO et al., 1995). Em microscopia confocal foram estudados fibroblastos de pulmão humano, a mesma proteína foi localizada 17% na membrana e 83% localizada no lúmen lisossomal, tendo sido descrita inclusive em lisossomas tubulares (AGARRABERES, TERLECKY, DICE, 1997) como o observado neste estudo. A administração de Canova pode então estar favorecendo a degradação de proteínas nos endossomas/lisossomas já que, estando aumentada a atividade da  $Mg^{++}$ ATPase, pode-se sugerir que esteja aumentada a atividade da hsc73 que é dependente da atividade da enzima marcada, indicando indiretamente maior atividade do complexo MHC II.

A principal função dos corpos lipídicos é armazenar lipídios neutros como fonte de energia, fonte de componentes necessários à biogênese de membranas e fonte de componentes lipofílicos específicos, como hormônios esteróides. Têm sido reconhecidos como domínios intracelulares especializados envolvidos na formação de mediadores parácrinos da inflamação (eicosanóides) por células envolvidas em reações inflamatórias (MELO et al., 2003). Através de ensaios em microscopia confocal pudemos notar uma diminuição no número de corpos lipídicos nos grupos tratados. Sendo este número mais reduzido ainda quando os macrófagos fagocitaram leveduras. Essa diminuição pode ser explicada pelo possível consumo destas organelas ricas em ácido aracdônico, para síntese de mediadores inflamatórios e biogênese de membranas.

Dvorak observou uma grande proximidade dos corpos lipídicos a fagolisossomas de macrófagos durante a fagocitose de partículas de zimozam e sugeriu a influencia de filamentos intermediários que estariam envolvendo os corpos lipídicos (DVORAK et al., 1983). Não só a proximidade como também a internalização dos corpos lipídicos a fagolisossomas pode ser observada em nossos experimentos tanto na microscopia eletrônica de transmissão como na microscopia confocal. Pode-se observar que corpos lipídicos de macrófagos dos grupos tratados com Canova e controle do tratamento se concentram não somente em regiões

próximas como também no interior de vacúolos de macrófagos que fagocitaram ou não leveduras. Pode-se observar muito retículo endoplasmático ao redor dos corpos lipídicos muitas vezes contínuos aos fagossomas. Por essa razão torna-se fácil explicar a diminuição do número de corpos lipídicos observados, estes lipídios estariam sendo amplamente utilizados na biogênese de membranas e síntese de eicosanóides (ZWEYTICK, 2000). Os macrófagos aumentam muito seu volume citoplasmático e lançam muitas projeções citoplasmáticas quando são ativados, para que isso aconteça torna-se necessária à produção de membrana, consequentemente ocorrendo o consumo das reservas lipídicas celulares.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados e discutidos permitem que se estabeleçam as seguintes conclusões:

- Macrófagos peritoneais de camundongos são ativados quando o medicamento Canova é administrado tanto *in vitro* como *in vivo*;
- O medicamento Canova proporciona um aumento da atividade da enzima  $Mg^{++}$ ATPase e fosfatase ácida em macrófagos peritoneais quando administrado em camundongos ou aos cultivos celulares;
- O tratamento com o medicamento Canova proporciona um aumento nas funções relacionadas ao sistema endossoma/lisossoma;
- A enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) diminui sua atividade em macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com Canova, na interação ou não com leveduras;
- Ocorre uma diminuição na quantidade de corpos lipídicos de macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com Canova, na interação ou não com leveduras;
- Corpos lipídicos são frequentemente encontrados no interior de vacúolos citoplasmáticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 3<sup>a</sup> ed., Revinter, Rio de Janeiro, 2000.

AGARRABERES, F.; TERLECKY, S.; DICE, J.F. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. **J. Cell Biol.** n.137, p.825-834, 1997.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**, 3<sup>a</sup> ed., Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.

ANDERSON, T.R.; TOVERUD, S.U. Purification and characterization of purple acid phosphatase from developing rat bone. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.247, p.131-139, 1986.

ANDERSSON, G.; EK-RYLANDER, B.; HAMMARSTRÖM, L.E. Purification and characterization of a vanadate-sensitive nucleotide tri- and diphosphatase with acid pH optimum from rat bone. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 228, p.431-438, 1984.

ANGERMÜLLER, S. and FAHIMI, D.H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem. J.**, v.14, p.823-825, 1982.

ANTANAITIS, B.C.; AISEN, P. Effects of perturbants on the pink (reduced) active form of uteroferrin. Phosphate-induced anaerobic oxidation. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.751-756, 1985.

AUGER, M.J.; ROSS, J.A. The biology of the macrophages. In: **The natural immune system: the macrophage**. Eds. C.E. Lewis & J.O.D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p.1-57, 1992.

BALLOW, M.; NELSON, R. Immunopharmacology – Immunomodulation and Immunotherapy. **JAMA**, v.278, n.22, p. 2008-2017, 1997.

BAROLLO, C.R. **Aos que se tratam pela homeopatia**. 7<sup>a</sup>ed., São Paulo, Typus ed.,1995.

BOES, M.; CUVILLIER, A.; PLOEGH, H. Membrane specializations and endosome maturation in dendritic cells and B cells. **TRENDS in Cell Biology**, v.14, n.4, p. 175-183, 2004.

BOZZA, P. T. *et al.* NS-398: Cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.67, n.4, 237-244, 2002.

BOZZA, P. T. *et al.* Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. **J. Leukocyte Biol.**, v.64, p.563–569, 1998.

BOZZA, P. T., WELLER, P.F. Arachidonyl trifluoromethyl ketone induces lipid body formation in leukocytes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.64, p.227-230, 2001.

BOZZA, P.T. *et al.* Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **J. Exp. Med.** v.186, p.909-920, 1997.

BUCHI, D.F.; DE SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Struc. Funct.**, v.18, p. 399-407, 1993.

BUCHI, D.F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.24, n.1, p.135-141,1992.



CARVALHO, L.; DE SOUZA, W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachizoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. **Journal of Protozoology**, v.36, n.2, 1989

CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. and COIMBRA, E.S. Internalization of components of the host cell plasma membrane during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, suppl. 1, p.143-147, 1999.

CHEUNG, C.K. *et al.* Immunoassay of a tartrate-resistant acid phosphatase in serum. **Clin. Chem.**, v.41, p.679-686, 1995.

CHIANG, H.L., TERLECKY, S.R.; PLANT, C. P.; DICE, J.F. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. **Science**, v.246, n.382-385, 1989.

CHOW, A. *et al.* Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. **Nature**, v.418, n.6901, p.923-924, 2002.

CLARK, *et al.* Ultrastructural localization of tartrate-resistant, purple acid phosphatase in rat osteoclasts by histochemistry and immunocytochemistry. **J. Bone Miner. Res.**, v.4, p. 399-405, 1989.

CLARK, S.A. Ultrastructural localization of tartrate-resistant, purple acid phosphatase in rat osteoclasts by histochemistry and immunocytochemistry. **J. Bone Miner. Res.**, v.4, p.399-405, 1989.

CLOVER, A. **Homeopatia**. 1<sup>a</sup> ed., Estampa, Lisboa, 1993.

COHN, Z. A. The activation of mononuclear fagocytes: fact, fancy, and future. **The Journal of Immunology**, v.121, n.3, p.813-816, 1978.

CRANS, D.C.; SIMONE, C.M.; HOLZ, R.C.; QUE, L. Jr. Interaction of porcine uterine fluid purple acid phosphatase with vanadate and vanadyl cation. **Biochemistry**, v.31, p.11731-11739, 1992.

CUERVO, A.M.; DICE, J.F.; KNECHT, E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. **J. Biol. Chem.**, n.272, p.5606-5615, 1997.

CUERVO, A.M.; KNECHT, E.; TERLECKY, S.R.; DICE, J.F. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. **Am. J. Physiol.**, v.269, C1200-C1208, 1995.

CZOP, J.K.; KAY, J. Isolation and characterization of the  $\beta$ -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.** v.173, p. 1511, 1991.

DASSA, E.; BOUIGE, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Research in Microbiology**, v.152, n.3-4, p. 211-229, 2001.

DE ARAÚJO, P.S.; MIES, V.; ORLANDO, M. Subcellular distribution of low- and high- molecular-weight acid phosphatases. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.452, 121-130, 1976.

DE SOUZA, W. *et al.* **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 1<sup>a</sup>ed., Departamento de Editoração Eletrônica da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro, 1998.

DELMAS, P.D. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. **Bone**, v.13, Suppl 1, p.17-21, 1992.

DICKENS, B.F. *et al.*, Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Lett.* v. 311, p. 187-191, 1992.

DREXLER, H.G.; GIGNAC, S.M. Characterization and expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in hematopoietic cells. **Leukemia**, v.8, p.359-368, 1994.

DVORAK, A.M. *et al.* Human lung mast cell and alveolar macrophage cytoplasmic lipid bodies contain arachidonic acid and prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase), the substrate and enzyme necessary for prostaglandin production. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.99, p.208-217, 1992.

DVORAK, A.M. *et al.* Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. **The Journal of Immunology**, v.131, n.6, p.2965-2976, 1983.

DVORAK, A.M. *et al.* Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and murine 3T3 fibroblasts. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.105, p.245-250, 1994.

DVORAK, A.M. *et al.* Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes and neutrophils. **J. Histochem. Cytochem.**, v.40, p.759-769, 1992.

ERWIG, L. P. *et al.* Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **Journal Immunology**, Baltimore, v.161, n.4, p.1983-8, 1998.

ESKELINEN, E.L.; TANAKA, Y.; SAFTIG, P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. **TRENDS in Cell Biology**, v.14, n.3, p.137-145, 2003.

EZEKOWITZ, R.A.B.; SATRY, K.; BAILLY, P.; WARNER, A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells, **J. Exp. Med.**, v.172, p. 1785, 1990.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p.189-216, 2001.

GARIN, J. *et al.* The phagosome proteome: insight into phagosome functions. **The Journal of Cell Biology**, v.152, n.1, p.165-180, 2001.

GEUZE, H.J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. **Immunology Today**, v.19, n. 6, p.282-287, 1998.

GODOY, L.M.F. **Efeitos do medicamento Método Canova sobre aspectos funcionais de macrófagos**, Curitiba 2002. Tese de mestrado – Universidade Federal do Paraná.

GORDON, S. *et al.* Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **Journal Cell Science**, suppl. 9, p. 1-26, 1988.

GREEN, S.J.; ANIAGOLU, J.; RANEY, S.J. Oxidative metabolism in murine macrophages. **Current Protocols in Immunology**, Supl. 12, New York, 1994.

GREENWALD, R.A.; RUSH, S.W.; MOAK, S.A.; WEITZ, Z. Conversion of superoxide generated by polymorphonuclear leukocytes to hydroxyl radical: a direct spectrophotometric detection system based on degradation of deoxyribose. **Free Radic. Biol. Med.**, v.6, p.385-392, 1989.

GRIFFITHS, G. *et al.* The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. **Cell**, n.52, p.329-341, 1988.

GRUENBERG, J. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p. 382-388, 2003.

GRUENBERG, J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.2, n.10, p.721-730, 2001.

HALLEEN, J.M. *et al.* Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.22907-22910, 1999.

HALLEEN, J.M.; HENTUNEN, T.A.; HELLMAN, J.; VÄÄNÄNEN, H.K. Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay. **J. Bone Miner. Res.**, v.11, p.1444-1452, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. **Free radicals in biology and medicine**, New York: Oxford University Press, p.544-616, 1999.

HARTWIG, A. Role of magnesium in genomic stability. **Mutation Research**, v.475, p. 113-121, 2001.

HAYMAN, A.R. *et al.* Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization to dendritic cells and diverse murine tissues. **J. Histochem. Cytochem.**, v.48, p.219-228, 2000.

HAYMAN, A.R. *et al.* Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas. **Biochem. J.**, v.261, p.601-609, 1989.

HAYMAN, A.R.; COX, T.M. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.2, p.1294-1300, 1994.

HAYMAN, A.R.; COX, T.M. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the

recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.1294-1300, 1994.

HOPKINS, C.R. Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. **Cell**, v.35, p.321-330, 1983.

JAMUR, M.C.; VUGMAN, I. and HAND, A.R. Ultrastructural and Cytochemical studies of acid phosphatase and trimetaphosphatase in rat peritoneal mast cells developing in vivo. **Cell Tissue Research**, v.244, p.557-563, 1986.

JANCKILA, A.J. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase activity of hairy cell tartrate-resistant acid phosphatase. **Leukemia**, v.6, p.199-203, 1992.

JOHNSON, S. The multifaceted and widespread pathology of magnesium deficiency. **Medical Hypotheses**, v.56, n.2, p.163-170, 2001.

JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da homeopatia**. Rio de Janeiro, p. 13-19, 21-28, 61-78, 1996.

KAIJA, H. *et al.* Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian purple acid phosphatase are functionally independent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.292, p.128-132, 2002.

KAPLAN, B. Homeopathy: What is it? **Prof. Care Mother Child**, v.4, n.5, p.151-152, 1994.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v.27:137 A, 1965.

KARNOVSKY, M.L.; LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. **The Journal of Immunology**, v.121, n.3, p.809-813, 1978.

KEOUGH, D.T.; BECK, J.L.; DE JERSEY, J.; ZERNER, B. Iron-containing acid phosphatases: interaction of phosphate with the enzyme from pig allantioic fluid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.108, p.1643-1648, 1982.

KEOUGH, D.T.; DIONYSIUS, D.A.; DE JERSEY, J.; ZERNER, B. Iron-containing acid phosphatases: characterization of the metal-ion binding site of the enzyme from pig allantioic fluid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.94, p.600-605, 1980.

KETCHAM, C.M.; BAUMBACH, G.A.; BAZER F.W.; ROBERTS, R.M. The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. Purification, properties, immunological characterization, and comparison with porcine uteroferrin. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.5768-5776, 1985.

KILLISCH, I. *et al.* Characterization of early and late endocytic compartments of the transferrin cycle Transferrin receptor antibody blocs erytroid differentiation by trapping the receptor in the early endosome. *J. Cell Sci.* v.103, p.211-232, 1992.

KLEIJMEER, M. *et al.* Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II 11 antigen presentation by dendritic cells. **Journal of Cell Biology**, v.155, n.1, p.53-63, 2001.

KLIMP, A.H. *et al.* A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, *in press*.

KORNFELD, S.; MELLMAN, I. The biogenesis of lysosomes. **Annu. Rev. Cell Biol.**, n.5, p.483-525, 1989.

LAM, K.W.; DEKKER, P.T.; CASTLEMAN, J.; YAM, L.T. Studies of intracellular distribution of acid phosphatase 5 in the spleen cells of leukemic reticuloendotheliosis by isopycnic gradient centrifugation. **Clin. Chim. Acta**, v.70, p.289-295, 1976.

LASSER, A. The mononuclear phagocytic system: a review. **Human Pathology**, v.14, n.2, p. 108-125, 1983.

LOPES, L. **Citoquímica ultraestrutural de enzimas em macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova®**. Curitiba, 2002. Monografia - Universidade Federal do Paraná.

LORD, K.D. *et al.* Type 5 acid phosphatase - Sequence, expression and chromosomal localization of a differentiation-associated protein of the human macrophage. **Eur. J. Biochem.**, v.189, p.287-293, 1990.

LUDWIG, T.; GRIFFITHS, G.; HOFLACK, B. Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells. **J. Cell Biol.**, v.115, p.1561-1572, 1991.

LUO, Z.R.; ROBINSON, J.M. Co-localization of an endocytic marker and acid phosphatase in a tubular/reticular compartment in macrophages. **J. Histochem. Cytochem.**, v.40, n.1, p.93-103, 1992.

MALPUECH-BRUGERE, C. *et al.* Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress. **Br. J. Nutr.**, v.81, p. 405-411, 1999.

MARSHALL, K. *et al.* Recombinant human and mouse purple acid phosphatases: expression and characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.345, n.2, p.230-236, 1997.

MEIRELLES, M.N.L. and DE SOUZA, W. The fate of plasma membrane macrophage enzyme markers during endocytosis of *Trypanosoma cruzi*. **J. Sulmicroscopic Cytology**, v.18, p.99-107, 1986.



MEIRELLES, M.N.S.L. **Alguns aspectos da interação *Trypanosoma cruzi* – Macrófago**. Rio de Janeiro, 1983. Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MELO, R. C. N. *et al.* Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: Putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue and Cell**, v.35, p.59-67, 2003.

MURK, J.L. *et al.* The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 13, n.4, p.303-311, 2002.

MURTAUGH, M.P.; FOSS, D.L. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.87, p.109-121, 2002.

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.319-326, 1987.

NORTH, R.J. The concept of the activated macrophage, **The Journal of Immunology**, v.121, n.3, 1978.

OLEA, M.T. A structural localization of lysosomal acid phosphatase activity in aging mouse spleen: a quantitative x-ray microanalytical study. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 24, n.2, p.201-208, 1991.

OLIVEIRA, C.C. **Deteção de produtos reativos intermediários de oxigênio em macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova**. Curitiba, 2002. Monografia - Universidade Federal do Paraná.

PARKIN, J. An overview of the immune system. **The Lancet**, v.357, p.1777-1789, 2001.

PANJWANI, N. *et al.* The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation. **The Journal of Immunology**, v.163, p.1936-1942, 1999.

PATERSON, I.C.M. Homeopathy: What is it and is it of value in the care of patients with cancer? **Clinical Oncology**, v.14, p.250-253, 2002.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production,  $\alpha_5 \beta_1$  integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **J. Submicrosc. Cytol. and Pathol.**, v.3, 2002.

PLAYFAIR, J. **Infection and Immunity**. Oxford University Press Inc., New York, 1995.

POOLE, B.; OHKUMA, S. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. **J. Cell Biol.**, v.90, p.665-669, 1981.

RÄISÄNEN, S.R.; HALLEEN, J.; PARIKKA, V.; VÄÄNÄNEN, H.K. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Facilitates Hydroxyl Radical Formation and Colocalizes with Phagocytosed Staphylococcus aureus in Alveolar Macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.288, p.142-150, 2001.

RAYSSIGUIER, Y. *et al.*, Magnesium and ageing. I. Experimental data: importance of oxidative damage. **Magnesium Res.**, v.6, p.369-378, 1993.

REINHOLT, F.P.; WIDHOLM, S.M.; EK-RYLANDER, B.; ANDERSSON, G. Ultrastructural localization of a tartrate-resistant acid ATPase in bone. **J. Bone Miner. Res.**, v.5, p.1055-1061, 1990.

RIES, W.L.; KEY, L.L.JR.; RODRIGUIZ, R.M. Nitroblue tetrazolium reduction and bone resorption by osteoclasts in vitro inhibited by a manganese-based superoxide dismutase mimic. **J. Bone Miner. Res.**, v.7, p.931-939, 1992.

ROBINSON, D.B.; GLEW, R.H. A tartrate-resistant acid phosphatase from Gaucher spleen. Purification and properties. **J. Biol. Chem.**, v.255, p.5864-5870, 1980.

ROBINSON, J.M. and KARNOVSKY, M.J. Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v.31, n.10, p.1197-1208, 1983.

RUIZ, R. **A montagem da teoria da dinamização dos medicamentos homeopáticos de Samuel Hahnemann**. São Paulo, 1999. Tese de doutorado - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

SARIS, N.E.L. *et al.* Magnesium: Na update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clinica Chimica Acta**, v.294, p.1-26, 2000.

SASAKI, M.G.M. *et al.* Estudo clínico randomizado placebo controlado para avaliar a eficácia e segurança do Método Canova® na terapêutica de pacientes portadores de HIV/Aids em uso de anti-retrovirais. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, Supl.1, 2001.

SATO, D.Y.O. **Efeito do Método Canova sobre os parâmetros leucocitários em camundongos normais e portadores de sarcoma 180**. Curitiba, 2002. Tese de mestrado – Universidade Federal do Paraná.

SCHINDELMEISER, J.; GULLOTTA, F.; MUNSTERMANN, D. Purple acid phosphatase of human brain macrophages in AIDS encephalopathy. **Pathol. Res. Pract.**, v.185, p.184-186, 1989.

SEADI, C. **Princípios Básicos de Imunologia**. 1ª ed., Ulbra, Canoas, 1998.

SILVA, M.H.C.; QUELUZ, T.H.A.T. Macrófagos pulmonares. **Journal Pneumology**, v. 22, n. 1, p. 45-8, 1996.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G. **Imunologia Médica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

SUTER *et al.* Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (AcP5) revealed by doubly deficient mice. **Development**, v.128, p.4899-4910, 2001.

TEIXEIRA, C.F. *et al.* Cytochemical study of *Streptococcus agalactiae* and macrophage interaction. **Microscopy Research and Technique**, v.54, p.254-259, 2001.

TJELLE, T.E.; BRECH, A.; JUVET, L.K.; GRIFFITHS, G.; BERG, T. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2905-2914, 1996.

THORNTON, B.P.; VETVICKA, V.; PITMAN, M.; GOLDMAN, R.C.; ROSS, G.D. Analysis of the sugar specificity and molecular localization of the  $\beta$ -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD 18). **J. Immunol.** v.156, p. 1235, 1996.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.**, v.20, p.825-852, 2002.

VANE, J.R. *et al.* Inducible isoforms of ciclooxigenases and nitric oxide synthase in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.2046-2050, 1994.

VILLADANGOS, J.A.; PLOEGH, H.L. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? **Immunity**, v.12, p.233-239, 2000.

VINHKO, P. *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human prostatic acid phosphatase. **FEBS Lett**, v.236, p.275-281, 1988.

WAL, R. **Estudo histopatológico do sarcoma 180 de camundongos tratados com medicamento homeopático Método Canova**. Curitiba, 2002. Tese de mestrado – Universidade Federal do Paraná.

WELLER, P.F.; DVORAK, A.M. Lipid bodies: Intracellular sites for eicosanoid formation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.94, p.1152-1156, 1994.

YU, W. *et al.* Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic PLA2 at cytoplasmic lipid bodies of U937 cells. **Am. J. Pathol.**, v.152, p.759-769, 1998.

ZHANG, F. *et al.* M-ABC2, a new human mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. **FEBS Letters**, v. 478, n.1-2, p.89-94, 2000.

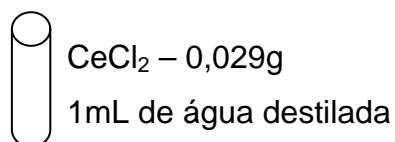
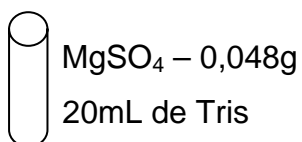
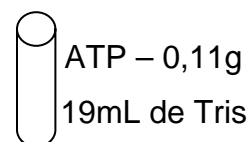
ZWEYTICK, D.; ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.101-120, 2000.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

**DETECÇÃO DA ENZIMA  $Mg^{++}$ ATPase**

1. Cultivar as células em garrafas de cultura de 150 mL,  $10^7$  células por garrafa, uma garrafa por grupo de tratamento.
2. Lavar com tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose);
3. Pré-fixar em glutaraldeído 1% em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose), durante 10 minutos à 4°C;
4. Lavar em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose);
5. Lavar em tampão Tris-maleato de Sódio (0,05 M - pH 7,2 - 5% sacarose);
6. Incubar à 37° C por 1 hora, com leve agitação a cada 10 minutos, em meio contendo Cloreto de Cério 3mM, ATP 5mM, Sulfato de magnésio 10mM, Tris-maleato de Sódio (0,05M - pH 5,0 - 5% sacarose), segundo esquema abaixo:

**Frasco I****Frasco II****Frasco III**

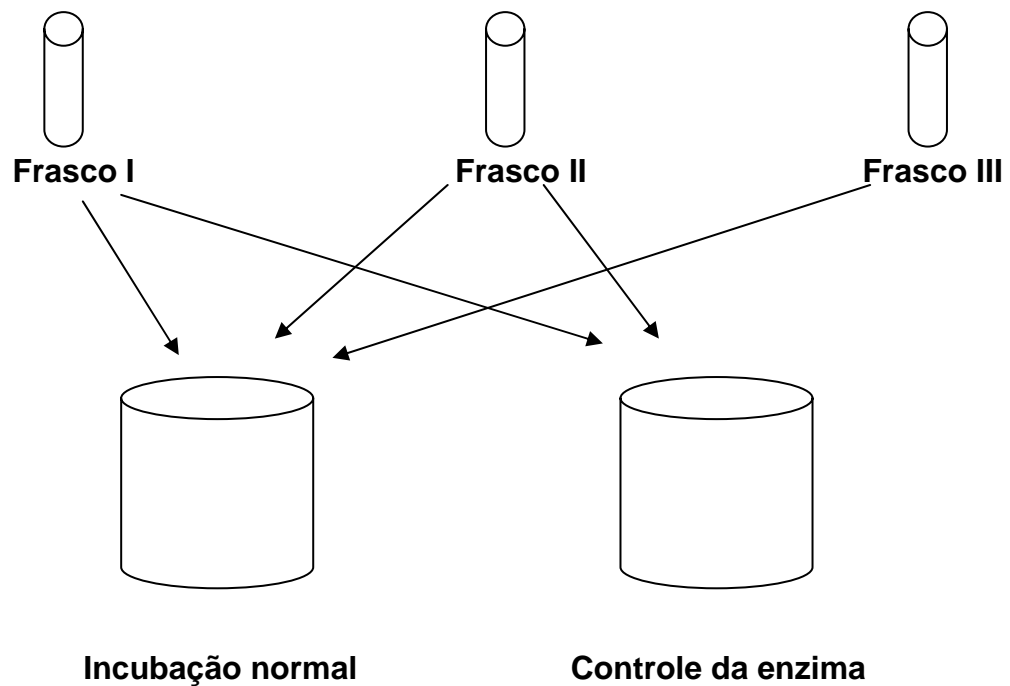
OBS: a água deve ser adicionado gota a gota no CeCl<sub>2</sub> para que não se forme precipitado e a solução não fique turva.

**Meio de incubação normal (para grupos tratados, controle e diluente)**

- ✓ 15ml do frasco II
- ✓ 19ml do frasco III
- ✓ Completar até 40mL com Tris-maleato de Sódio (0,05 M - pH 7,2 - 5% sacarose)
- ✓ 0,75ml do frasco I (gota a gota)

**Meio de controle da enzima (sem ATP)**

- ✓ 5ml do frasco II
- ✓ 0,25ml do frasco I
- ✓ Completar até 10mL com Tris-maleato (0,05 M - pH 7,2 - 5% sacarose)



OBS: Caso o meio de incubação normal fique turvo deve ser filtrado.

7. Passada uma hora, descarta-se o meio;
8. Lavar com tampão Tris-maleato de Sódio (0,05M - pH 7,2 - 5% sacarose);
9. Lavar em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose);
10. Fixar por uma hora no fixador de Karnovsky (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5mM);
11. Descartar o fixador e adicionar Tampão.Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2);
12. O experimento pode ser parado e continuado no dia seguinte, guardando as garrafinhas em geladeira;
13. Processar material para microscopia eletrônica de transmissão (ANEXO 2).



## ANEXO 2

**MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**




1. Fixar as células segundo o descrito para cada experimento, Karnovsky ou glutaraldeído;
2. Raspar as garrafas de cultivo, transferir para tubos de centrifuga e centrifugar para formar um *pellet* de macrófagos;
3. Lavar 2 vezes com tampão Cacodilato de Sódio 0,1M - pH7,2;
4. Transferir para tubos eppendorfs;
5. Centrifugar e desprezar o sobrenadante;
6. Pós-fixar durante 1 hora, no escuro, com Tetróxido de Ósmio 1% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M - pH7,2 (Pode-se ainda adicionar Ferricianeto de Potássio 0,8% e Cloreto de Cálcio 2 mM);
7. Lavar 2 vezes com tampão Cacodilato de Sódio 0,1M - pH7,2;
8. Desidratar em acetona:
9. Acetona 70%;
10. Pode-se parar e continuar no dia seguinte;
11. Acetona 70% - 10 minutos;
12. Acetona 90% - 2 vezes de 10 minutos;
13. Acetona 100% - 2 vezes de 10 minutos;
14. Incluir em Epon:
15. MISTURA I: Acetona/Epon 2:1 - *overnight*;
16. MISTURA II: Acetona/Epon 1:1 - *overday*;
17. MISTURA III: Acetona/Epon 1:2 - *overnight*;
18. Colocar Epon puro e etiquetar - *overday*;
19. Polimerizar em estufa à 60°C durante 4 dias;
20. Obter cortes ultrafinos;
21. Observar em microscópio eletrônico de transmissão, sem contrastação.

OBS: Todo o material utilizado (tubos de centrifuga, eppendorfs, pipetas e ponteiros) deverão ser siliconizados, com a finalidade de evitar perda de células por adesão nas paredes destes.

## ANEXO 3

**DETECÇÃO DA ENZIMA AcPase**

1. Cultivar celular em garrafas de cultura de 150 mL,  $10^7$  células por garrafa, uma garrafa por grupo de tratamento.
2. Lavar 2 vezes com tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose), a 4°C;
3. Pré-fixar em glutaraldeído 1% em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose), durante 10 minutos à 4°C;
4. Lavar em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose);
5. Lavar em tampão Tris-maleato de Sódio (0,05M - pH 5,0 - 5% sacarose);
6. Incubar à 37° C por 1 hora, com leve agitação a cada 10 minutos, em meio contendo Cloreto de Cério 2mM,  $\beta$ -Glicerofosfato 2mM, Tris-maleato de Sódio (0,05M - pH 5,0 - 5% sacarose), segundo esquema abaixo:

<b>Frasco I</b>		<b>Frasco II</b>		<b>Frasco III</b>	
CeCl <sub>2</sub> – 0,029g		$\beta$ -Glicerofosfato – 0,017g		Fluoreto 10mM - 4,2 $\mu$ L	1mL
de água destilada		10mL de Tris-maleato		1mL de Tris-maleato	

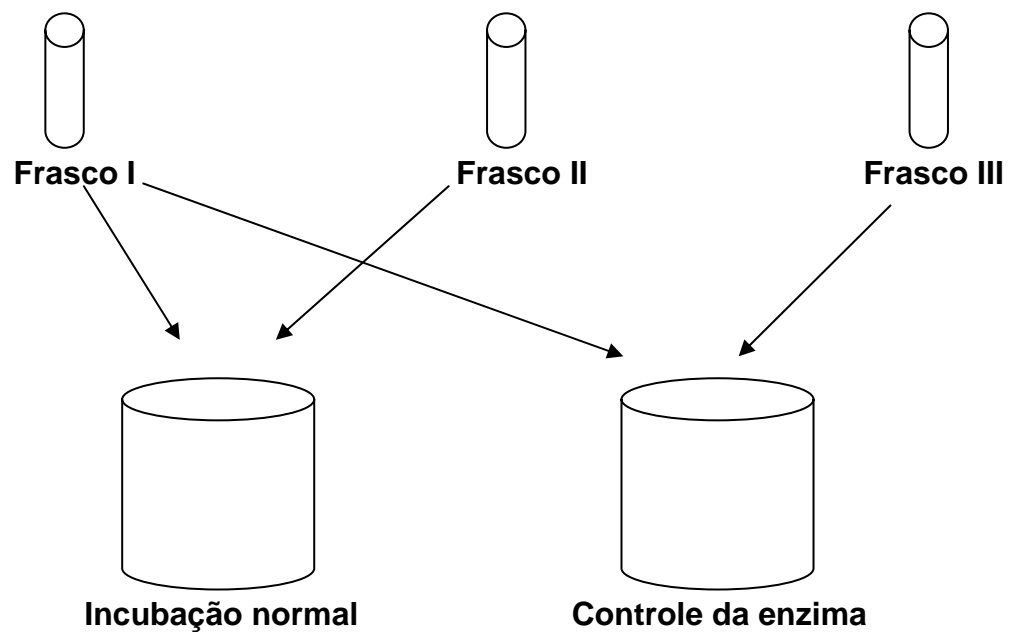
OBS: a água deve ser adicionada gota a gota no CeCl<sub>2</sub>, sempre agitando, para que a solução não fique turva. Caso isso aconteça, deve-se filtrar a solução.

**Meio de incubação normal (para grupos tratados, controle e diluente)**

- ✓ 10mL do frasco II
- ✓ 0,75mL do frasco I (gota a gota)
- ✓ Completar até 30mL com Tris-maleato de Sódio (0,05M - pH 5,0 - 5% sacarose);

**Meio de controle da enzima (sem ATP)**

- ✓ 1ml do frasco III
- ✓ 0,25ml do frasco I (gota a gota)
- ✓ Completar até 10mL com Tris-maleato de Sódio (0,05M - pH 5,0 - 5% sacarose);



7. Lavar com tampão Tris-maleato de Sódio (0,05M - pH 5,0 - 5% sacarose);
8. Lavar com tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2 - 5% sacarose);
9. Fixar em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5mM;
10. Processar material para microscopia eletrônica de transmissão (ANEXO 2).

## ANEXO 4

**MÉTODO DO ÓSMIO - IMIDAZOL**

1. Cultivar os macrófagos em garrafas de cultura de 150 mL,  $10^7$  células por garrafa, uma garrafa por grupo de tratamento;
2. Preparar uma solução estoque de Imidazol 0,2 M. Acertar o pH dela para 7,5;
3. Preparar uma solução estoque de Tetróxido de Ósmio à 4%;
4. Fixar por 1 hora em glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2), durante 1 hora 4°C;
5. Lavar 2 vezes de 10 minutos em tampão Cacodilato de Sódio (0,1 M - pH 7,2);
6. Lavar por 10 minutos em tampão Imidazol (0,1 M - pH 7,5);
7. Pós-fixar por apenas 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente, com Tetróxido de Ósmio a 2% em tampão Imidazol (0,1 M - pH 7,5), ou seja, misturar as soluções estoque dos itens 1 e 2 na proporção 1:1

**OBSERVAÇÃO:**

Preparar a mistura ósmio-imidazol somente na hora do uso, direto no vidro onde está o material, adicionando primeiro o Imidazol 0,2 M ao material, e depois gotear (e ir agitando a mistura) o ósmio a 4% até atingir a proporção 1:1;

8. Após 30 minutos a solução deve ficar ligeiramente marrom. Não deixe mais de 30 minutos.
9. Lavar 2 vezes de 10 minutos em tampão Imidazol (0.1 M - pH 7.5)
10. Processar para microscopia eletrônica de transmissão (ANEXO 2), desidratando em acetona e incluindo em Epon;

## ANEXO 5

**"SIGMA DIAGNOSTICS ACID PHOSPHATASE KIT"**

1. Cultivar os macrófagos durante 48 horas;
2. Interação ou não com leveduras;
3. Fixar as células com solução diluída de citrato: 1mL de citrato concentrado (nº386-1), 9mL de água destilada e 15 mL de acetona.
4. Enxaguar em água destilada e deixar secar.
5. Preparar o meio de incubação segundo ordem e quantidades descritas no quadro abaixo:

	<b>AcPase total</b>	<b>TRAP</b>	<b>Controle</b>
Água destilada 37°C	3,4mL	3,7mL	3,2mL
Solução de acetato (nº386-3)	0,3mL	0,3mL	0,3mL
Ácido Naftol AS-BI fosfórico (nº386-4)	0,3mL	0,3mL	_____
Solução de tartarato (nº386-2)	_____	0,3mL	_____
Fluoreto 100mM	_____	_____	0,8mL
1 caps. Fast Garnet GBC Salt (nº386-15) em 12 mL dH <sub>2</sub> O	4mL	4mL	4mL
Volume final	8,3mL	8,3mL	8,3mL

6. Filtrar e aquecer os meios de incubação em banho-maria à 37°C, antes de colocá-los na placa;
7. Incubar durante 1 hora, à 37°C, no escuro;
8. Lavar em água destilada por 3 minutos;
9. Corar com a solução de hematoxilina (nº285-2) por 5 minutos;
10. Lavar em água destilada por 3 minutos;
11. Montar a lâmina com glicerol.